

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET**

**Ljiljana Skendžić**

**DEGENERATIVNE PROMJENE FIBROBLASTA I KOLAGENA**  
**UZROKOVANE KRONOLOŠKIM I FOTOSTARENJEM KOŽE**

**Specijalistički rad**

**Zagreb, 2015**

Poslijediplomski specijalistički studij Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: Doc. dr. sc. Jasmina Lovrić

Specijalistički rad obranjen je dana 31. ožujka 2015. godine na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Domagojeva 2, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. Doc. dr. sc. Jasmina Lovrić  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. Prof. dr. sc. Mirna Šitum  
Sveučilište u Zagrebu  
Stomatološki fakultet

Rad ima 97 listova.

Ovaj specijalistički rad izrađen je u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasmine Lovrić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasmini Lovrić na beskonačnom strpljenju, uloženom trudu, stručnim savjetima, uputama i potpori tijekom izrade ovog rada. Ujedno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci.

## SAŽETAK

### *CILJ ISTRAŽIVANJA*

Cilj predloženog specijalističkog rada je pregledno opisati i kritički raspraviti nove spoznaje povezane s degenerativnim promjenama fibroblasta i kolagena kao ključnog mehanizma kronološkog i fotostarenja kože sa naglaskom na kozmeceutike i dermatokozmetičke pripravke koji se koriste ili ispituju u svrhu preveniranja i/ili usporavanja tih degenerativnih promjena.

### *MATERIJALI I METODE*

Pretraživanje literature obavljeno je elektroničkim putem, a pretražena je baza podataka PubMed. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovog specijalističkog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovog specijalističkog rada.

### *REZULTATI*

Propadanje kolagenskog matriksa dermisa kože karakteristična je osobina kronološki ostarjele kože, a ta je promjena ubrzana kod fotooštećene kože. U organizaciji i održavanju kolagenskog matriksa ključnu ulogu igra mehanička napetost fibroblasta odgovornih za sintezu kolagena. Smanjenje mehaničke napetosti koje se javlja starenjem kritična je pokretačka sila molekularnih promjena u podlozi starenja kože. Iako postoji mnoštvo kozmeceutika za koje se tvrdi da poboljšavaju izgled i funkciju ostarjele i/ili fotooštećene kože, samo je mali broj njih primjereno ispitan te određen mehanizam njihovog djelovanja.



## *ZAKLJUČAK*

Retinoidi su zasad najučinkovitiji u sprječavanju degenerativnih promjena dermisa, a vrlo važnu skupinu predstavljaju i peptidi koji stimuliraju aktivnost fibroblasta te potiču proizvodnju kolagena. Učinak topikalno primjenjenih kozmeceutika koji ublažavaju i/ili sprječavaju degenerativne promjene dermisa ograničen je njihovom permeacijom do mjesta učinka. Pristup za poboljšanje bioraspoloživosti kozmeceutika u dermisu ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima kozmeceutika te može uključivati: (i) modifikaciju same molekule kozmeceutika s ciljem poboljšanja lipofilnosti i/ili stabilnosti, (ii) dodatak pospješivača apsorpcije u formulaciju, (iii) uklapanje kozmeceutika u nosače nanometarskih dimenzija.

## SUMMARY

### *OBJECTIVES*

The objective of this thesis is a review and critical discussion of new pieces of knowledge about fibroblast and collagen degenerative changes as a key mechanism of chronological ageing and photoageing. Special emphasis was given to the cosmeceuticals and formulations which are being used or tested for prevention and/or slowing down of such degenerative changes.

### *MATERIALS AND METHODS*

Literature search was conducted electronically, with PubMed being the database searched. During the research of the literature, the answers to the specific questions related to the problems of this thesis were searched. The literature was researched from the general articles to the specialized articles, and the articles relevant for this thesis were selected.

### *RESULTS*

A major feature of aged skin is fragmentation of the dermal collagen matrix, and this fragmentation is accelerated by sunlight. The collagen network is organized and maintained by dynamic mechanical tension provided by the fibroblasts responsible for its production. Age related reduction of mechanical tension is a critical driving force for molecular changes that underlie the appearance of aged skin. Although there exists a multitude of cosmeceuticals that are claimed to improve appearance of chronologically/photoaged skin, only few have been rigorously evaluated and their mechanism of action elucidated.

## *CONCLUSION*

Amongst various anti-aging agents, retinoids are the most promising agents that are available for the treatment of aging dermis. Emerging agents are also peptides that stimulate fibroblast activity and induce collagen production. However, the efficacy of topically applied cosmeceuticals is restricted by their permeation to the site of their action. The approach to improve the dermal bioavailability of cosmeceuticals depends on their physicochemical properties of and may include: (i) modification of the molecule in order to improve its lipophilicity and/or stability, (ii) incorporation of absorption enhancers in the formulation, (iii) and the encapsulation of cosmeceutical into different nanocarriers.

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b>	<b>2</b>
1.1	GRAĐA I FUNKCIJA DERMISA	4
1.1.1	GRAĐA I FUNKCIJA KOŽE	4
1.1.2	STRUKTURA I FUNKCIJA KOLAGENA U DERMISU	10
1.1.3	BIOSINTEZA I METABOLIZAM KOLAGENA	13
1.2	REMODELIRANJE DERMISA USLIJED STARENJA: POSLJEDICE NA STRUKTURU I FUNKCIJU KOŽE	16
1.3	HISTOLOŠKI I KLINIČKI IZGLED KRONOLOŠKI OSTARJELE I FOTOOSTARJELE KOŽE	19
<b>2</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>RASPRAVA</b>	<b>25</b>
4.1	DEGENERATIVNE PROMJENE KOLAGENSKOG MATRIKSA U OSNOVI KRONOLOŠKOG STARENJA	25
4.1.1	NAKUPLJANJE FRAGMENTIRANOG KOLAGENA I GUBITAK MEHANIČKE NAPETOSTI TIJEKOM STARENJA	25
4.1.2	NARUŠENA RAVNOTEŽA IZMEĐU PROIZVODNJE I RAZGRADNJE KOLAGENA TIJEKOM STARENJA	27
4.2	DEGENERATIVNE PROMJENE KOLAGENSKOG MATRIKSA U OSNOVI FOTOSTARENJA	30
4.3	DRUGI STANIČNI I MOLEKULSKI MEHANIZMI STARENJA	33
4.3.1	GENOMSKA NESTABILNOST	33
4.3.2	SKRAĆIVANJE TELOMERA	35
4.3.3	EPIGENETSKE PROMJENE	35
4.3.4	GUBITAK PROTEOSTAZE	36
4.3.5	POREMEĆAJ FUNKCIJE MITOHONDRIJA	36
4.3.6	STANIČNA SENESCENCIJA	38
4.3.7	NEDOSTATAK MATIČNIH STANICA	39
4.3.8	POREMEĆAJ MEĐUSTANIČNE KOMUNIKACIJE	40
4.3.9	OKSIDACIJSKI STRES I STARENJE	41
4.4	KOZMECEUTICI KOJI POTIČU BIOSINTEZU KOLAGENA	44
4.4.1	RETINOIDI	44
4.4.2	VITAMIN C (L-ASKORBINSKA KISELINA)	51
4.4.3	VITAMIN E	53
4.4.4	KOENZIM Q10 (UBIKVINON)	54
4.4.5	PEPTIDI ZA TOPIKALNU UPORABU	55
4.4.6	ČIMBENICI RASTA KAO KOZMECEUTICI	59
4.4.7	MEHANIZAM DJELOVANJA TOPIKALNO PRIMJENJENIH ČIMBENIKA RASTA	62
4.4.8	LASERSKO POMLAĐIVANJE KOŽE UZ ČIMBENIKE RASTA	62
4.4.9	DERMALNI FILERI NA BAZI HIJALURONSKE KISELINE	63
4.5	DERMATOKOZMETIČKI PRIPRAVCI ZA SPRJEČAVANJE/UBLAŽAVANJE PROMJENA KOJE SE JAVLJAJU STARENJEM	66
4.5.1	PERMEACIJA KOZMECEUTIKA U DERMIS	66
4.5.2	PRISTUPI ZA POBOLJŠANJE BIORASPOLOŽIVOSTI KOZMECEUTIKA U DERMISU	71
4.5.3	INOVATIVNI DERMATOKOZMETIČKI PRIPRAVCI	73
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČAK</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>90</b>

## 1 UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Starenje je vrlo složen degenerativni proces koji je posljedica međudjelovanja brojnih molekulskih i staničnih mehanizama (1). Koža je najveći organ ljudskog tijela i u izravnom je dodiru s okolinom. Kao i drugi organi ljudskog tijela, mijenja se starenjem, ali proces starenja kože ubrzavaju vanjski čimbenici. Stoga, u procesu starenja kože razlikujemo intrinzično ili kronološko starenje te ekstrinzično ili vanjsko starenje od kojeg je najvažnije fotostarenje kože koje nastaje zbog prekomjernog kroničnog izlaganja ultraljubičastom (UV) sunčevom zračenju (2). Intrinzičko starenje kože karakteriziraju suptilne, ali progresivne promjene strukture kože koje rezultiraju progresivnim gubitkom njezine funkcije. Suprotno tome, fotostarenje je karakterizirano bržim upečatljivijim morfološkim i fiziološkim promjenama kože (3). U zadnjih 20 godina načinjen je značajan napredak u razumjevanju staničnih i molekulskih mehanizama koji su u osnovi kronološkog i fotostarenja kože koji otvaraju uzbudljive mogućnosti za razvoj pripravaka i postupaka za prevenciju ili usporavanje degenerativnih promjena kože pri starenju (2).

Koža je građena iz dva osnovna sloja, epidermisa i dermisa, a ispod kože nalazi se potkožno tkivo ili hipodermis. Starenje kože obuhvaća sve slojeve kože, a ovaj rad posebno naglašava promjene dermisa. Najbrojnije stanice dermisa kože su fibroblasti, odgovorni za biosintezu kolagena, elastina i drugih proteina izvanstaničnog matriksa te mukopolisaharida (glikozaminoglikana) i enzima (kolagenaza). Histološke značajke mlade kože su organizirana kolagenska vlakna i funkcionalni fibroblasti, dok je ostarjela koža karakterizirana smanjenom biosintezom i povećanom razgradnjom kolagena te propadanjem fibroblasta (4). Propadanje fibrilarnog kolagena je karakteristična osobina kronološki ostarjele kože, a ta promjena je ubrzana kod fotooštećene kože.

Dosadašnja istraživanja jasno pokazuju da je starenje kože posljedica različitih međusobno povezanih molekulskih mehanizama (5, 6). Iako postoji mnoštvo biološki aktivnih tvari za koje se tvrdi da poboljšavaju izgled i funkciju ostarjele i/ili fotooštećene kože, samo je mali broj njih primjereno ispitan. Postavlja se pitanje može li se starenje kože usporiti? Cilj predloženog specijalističkog rada je pregledno opisati degenerativne promjene dermisa kože povezane s kronološkim i fotostarenjem, pojasniti molekulske mehanizme nastanka takvih promjena te dati posebni osvrt na aktivne tvari i dermatokozmetičke pripravke koji se primjenjuju ili ispituju u svrhu prevencije i usporavanja takvih degenerativnih procesa.

## 1.1 GRAĐA I FUNKCIJA DERMISA

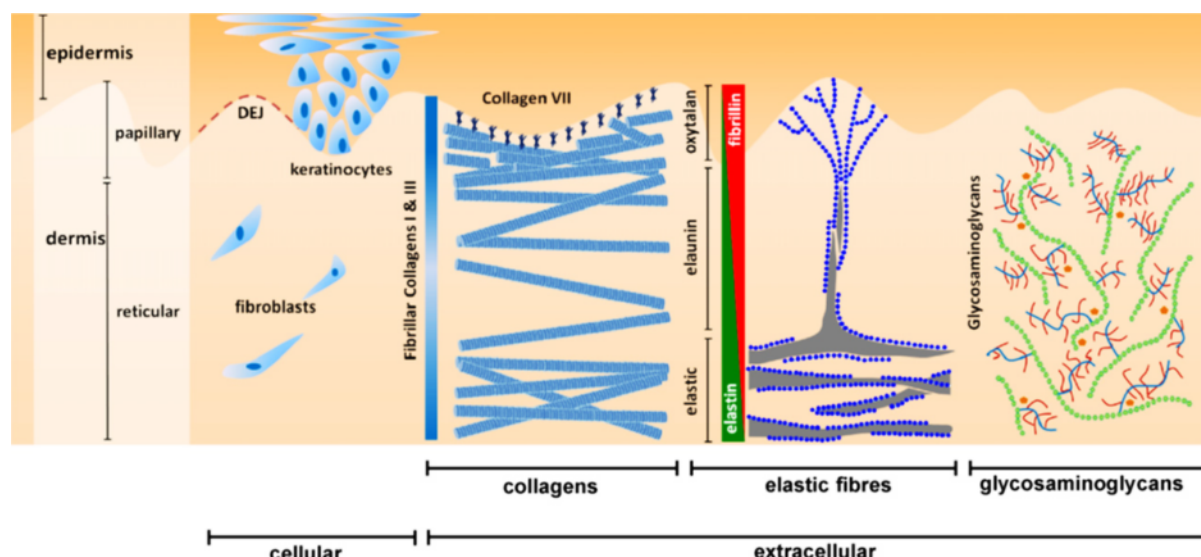
### 1.1.1 GRAĐA I FUNKCIJA KOŽE

Koža je veliki organ prosječne površine od oko 1,8 m<sup>2</sup> i prosječne mase od oko 5 kg. Tri su osnovne funkcije kože; zaštitna, osjetilna i regulatorna funkcija. Uloga kože se uglavnom, ostvaruje kroz građu epidermalnih i dermalnih slojeva. Epidermis je površinski sloj građen od višeslojnog pločastog pokrovnog epitela, a čini barijeru koja sprječava gubitak vode i topline te ulazak mikroorganizama. Keratinociti su najzastupljeniji tip stanica u epidermisu. Melanociti su također prisutni u epidermisu i odgovorni su za boju kože.

Dermis se nalazi ispod epidermisa i predstavlja strukturalnu potporu za vaskulaturu kože i epidermis. To je sloj gustog i nepravilnog vezivnog tkiva debljine 2 do 3 mm što čini većinu debljine kože (7). Dermalno vezivno tkivo sadrži kolagen i elastin; kolagenska vlakna čine većinu mase kože te osiguravaju vlačnu čvrstoću kože; elastična vlakna osiguravaju elastičnost i otpornost kože. Dermis je građen od strukturalno određenih papilarnih i retikularnih slojeva. Papilarni sloj je gornji i utisnut je u epidermis tako da on osim vezivnog tkiva sadržava i krvne kapilare, završetke živaca i osjetna tjelešca za dodir (Meissnerova tjelešca). Retikularni sloj leži ispod papilarnog sloja i u njemu se nalaze gusti snopovi kolagena upleteni u mrežu elastičnih vlakana, zatim krvne i limfne žile, živci, receptori za hladnoću, žlijezde lojnice i mišić koji podiže dlaku (8). Epidermis i dermis su spojeni složenim, valovitim veznim dermalno – epidermalnim slojem (engl. *dermoepidermal junction* DEJ). To je vrlo složena struktura, koja prati valovitu papilarnu liniju (8), a pri čemu su bazalni keratinociti hemidezmosomima povezani s bazalnom membranom bogatom kolagenom tipa IV, dok je dermis usidren vlaknima kolagena tipa VII i snopovima mikrofibrila bogatih fibrilinom (produžetci elastinskih vlakana koja se nazivaju oksitalan vlakna) (9).

## GLAVNE STRUKTURNE SASTAVNICE DERMISA

Dermalno vezivno tkivo gradi dermis i sadrži proteine izvanstaničnog matriksa kao što su kolagen i elastična vlakna, fibronektin, glikozaminoglikani i proteoglikani koje proizvode i izlučuju u izvanstanični prostor fibroblasti, glavna vrsta stanica u dermisu (slika 1) (10).

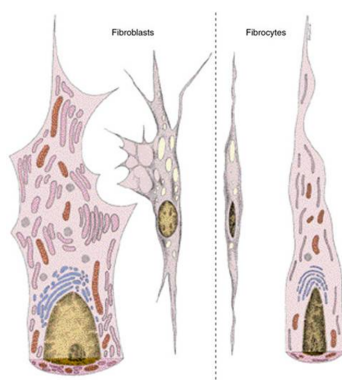


**Slika 1.** Stanične i izvanstanične komponente mlade kože (preuzeto iz (9)). Avaskularni epidermis se oslanja na prokrvljen dermis koji je bogat izvanstaničnim matriksom i građen od strukturalno određenih papilarnih i retikularnih slojeva. Stanična populacija kože je koncentrirana u epidermisu gdje su keratinociti vezani hemidesmosomima za specijaliziranu baznu membranu DEJ. U dermisu su rijetko raspoređeni fibroblasti odgovorni za sintezu izvanstaničnog matriksa. Fibrilarnih kolagena (I i III) ima u velikim količinama u mladom dermisu, a naročito ga ima u papilarnom i dubokom retikularnom dermisu. Za razliku od toga, kolagen VII se uglavnom nalazi samo u sidrenim vlaknima koji se nalaze u DEJ-u. Sustav elastičnih vlakana također ima i karakterističnu, vrlo uređenu arhitekturu u kojoj se okomito orijentirani fibrilin mikrofibrila u DEJ-u miješa sa elastičnim vlaknima velikog promjera bogatim elastinom iz retikularnog dermisa. Konačno, koži hidrataciju osiguravaju u prvom redu glikozaminoglikani kao što su hijaluronska kiselina i dermatan sulfat koji su raspoređeni po čitavom dermisu.

Fibroblasti su najbrojnije stanice vezivnog tkiva koje sintetiziraju kolagen, elastin, glikozaminoglikane, proteoglikane, adhezivne glikoproteine, fibronektin i druge proteine izvanstaničnog matriksa (11). Te stanice imaju dva stadija aktivnosti, aktivno stanje i stanje mirovanja (slika 2). Fibroblasti su stanice koje su vrlo aktivne u biosintezi, morfološki se



razlikuju od fibrocita, stanica u mirovanju. Aktivni fibroblast ima obilnu i nepravilno razgrananu citoplazmu, sa ovalnom i velikom jezgrom. Citoplazma obiluje hrapavim endoplazmatskim retikulumom, a Golgijev kompleks je dobro razvijen. Fibrocit ili fibroblast u mirovanju manji je od fibroblasta i vretenasta je oblika. Ima manje produžetaka od fibroblasta, acidofilnu citoplazmu s malom količinom hrapavog endoplazmatskog retikuluma. Na odgovarajući podražaj fibrocit se vraća u aktivno stanje i obnavlja svoju sintetsku aktivnost (11).



**Slika 2.** Aktivni fibroblast (lijevo) i fibroblast u mirovanju (desno) (preuzeto iz (11)).

Izvanstanični matriks vezivnog tkiva je složen sustav varijabilnih članova raznolike obitelji proteina koji određuju strukturni integritet i razne fiziološke funkcije (12).

Supramolekularni raspored fibrilarnih elemenata, mikrofibrilarne mreže kao i topljivi proteini, glikoproteini i razne druge molekule određuju biofizičke osobine izvanstaničnog matriksa. Sastav i struktura značajno variraju kod različitih tipova vezivnog tkiva. To je dinamična struktura koja daje tkivima za njih specifične mehaničke i biokemijske osobine. Stanice su zadužene za njegovu sintezu i održavanje, ali za uzvrat i izvanstanični matriks djeluje na funkciju stanica. Daje strukturnu potporu stanicama i tkivima i ima ulogu u brojnim staničnim procesima, uključujući i adheziju, migraciju, apoptozu, proliferaciju i diferencijaciju (12). Izvanstanični matriks je građen od kolagenskih, retikularnih i elastičnih

vlakana i od osnovne tvari. Osnovna tvar je građena od glikozaminoglikana, proteoglikana i adhezivnih glikoproteina sa sposobnošću višestrukog vezanja (fibronektin i drugi).

Proteini izvanstaničnog matriksa dermisa odgovorni su za integritet i arhitekturu kože. Stoga su promjene proteina dermisa ključne za promjene kože pri procesima starenja. Kolagen, posebno kolagen tipa I je najzastupljeniji i glavni strukturni protein kože koji koži daje čvrstoću i potporu. U vezivnom tkivu kože prisutni su i drugi tipovi kolagena (III, IV i VII).

Kolagen tipa I se udružuje s drugim proteinima izvanstaničnog matriksa fibrilogenezom pri čemu se stvaraju snopovi kolagena, koji su odgovorni za čvrstoću i elastičnost kože. Kolagenska vlakna pretežno prave raznosmjerne tračke (rombičke strukture) i mogu se dijagonalno razvlačiti, ali se ne mogu vratiti u prvobitan položaj bez elastičnih vlakana (8). Kolagen tipa III drugi je vlaknasti kolagen prisutan u koži, a budući da je najviše zastupljen u tkivu fetusa, naziva se fetalni kolagen. U koži fetusa količine kolagena tipa I i III su jednake, dok se u koži odraslih osoba nalaze veće količine kolagena tipa I te omjer kolagena tipa I i III iznosi 6:1 (11).

## ELASTIČNA VLAKNA

Elastična vlakna uglavnom se sastoje od elastina i fibrilina, a građena su tako da unakrsno vezana vlakna elastina čine centralnu jezgru vlakna, koje okružuju mikrofibrili bogati fibrilinom. Oni čine manje od 1-2 % težine kože, ali imaju funkcionalnu ulogu u odupiranju deformacijskim silama i daju elastičnost tako što čine finu mrežu (10).

U mladoj koži, sustav elastičnih vlakana ima karakterističnu i vrlo uređenu arhitekturu u kojoj se okomito postavljeni mikrofibrili bogati fibrilinom (oksitale vlakna) spajaju sa elastičnim vlaknima velikog promjera koja su uglavnom sastavljena od elastina iz retikularnog dermisa.

Do ovog spajanja dolazi na dermalno-epidermalnoj granici.

## GLIKOZAMINOGLIKANI I PROTEOGLIKANI

Glikozaminoglikani (GAG) su ravni polisaharidni lanci sastavljeni od ponavljajućih disaharidnih jedinica, koje se sastoje od uronske kiseline i heksozamina, gdje heksozamin može biti glukozamin ili galaktozamin, a uronska kiselina može biti glukuronska ili iduronska kiselina. Najzastupljeniji GAG-ovi u dermisu su hijaluronska kiselina (HA) i dermatan sulfat (8). S izuzetkom hijaluronske kiseline, ravni glikozaminoglikanski lanci su kovalentno vezani za središnji proteinski lanac, s kojim tvore molekulu proteoglikana. GAG imaju mnogo hidroksilnih, karboksilnih i sulfatnih skupina na svojim šećernim djelovima te su jako hidrofilni i djeluju kao polianioni. HA je jedini nesulfatni GAG (11).

Proteoglikani su glikoproteini kod kojih je barem jedan od oligosaharidnih pobočnih lanaca nerazgranat i obično dugačak glikozaminoglikan (GAG). U proteoglikanima prevladava ugljikohidratni dio. Zbog tih svojstava proteoglikani mogu vezati katione, obično natrij elektrostatskim vezama. Proteoglikani su molekule koje obilno vežu vodu tvoreći hidrirane gelove. Dermalni proteoglikani razlikuju se po veličini, od dekorina, malog proteoglikana bogatog leucinom koji se sastoji samo od jednog lanca glikozaminoglikana (SLRP), a za koji se smatra da igra glavnu ulogu u kontroli spajanja fibrila kolagena, do velikog proteoglikana agrekana koji se može sastojati od preko 100 pojedinačnih glikozaminoglikana. Zajedno, ovi hidrofilni glikoproteini i proteoglikani sa velikim količinama polimerne hijaluronske kiseline, raspoređuju se po cijelom dermisu gdje imaju glavnu ulogu u vezivanju i zadržavanje vode u koži time osiguravajući volumen dermisa/kože.

## FIBRONEKTIN I INTEGRINI

Fibronektin je adhezivni glikoprotein koji sintetiziraju fibroblasti i neke epitelne stanice. Adhezivni glikoproteini su tvari koji imaju proteinsku osnovu za koju se vežu ugljikohidrati.

Ugljikohidratni dio glikoproteina je često razgranat. Molekula ima posebna vezna mjesta za stanice, kolagen i glikozaminoglikane. Ta svojstva čine fibronektin posrednikom u prijanjanju i migraciji stanica (11). Međudjelovanje stanica i izvanstaničnog matriksa ostvaruje se putem staničnih površinskih molekula, receptora za izvanstanični matriks. To su integrini, površinski stanični receptori iz porodice transmembranskih proteina, koji povezuju stanice s kolagenom, fibronektinom i lamininom (11).

### MATRIKSNE METALOPROTEAZE I NJIHOVI INHIBITORI

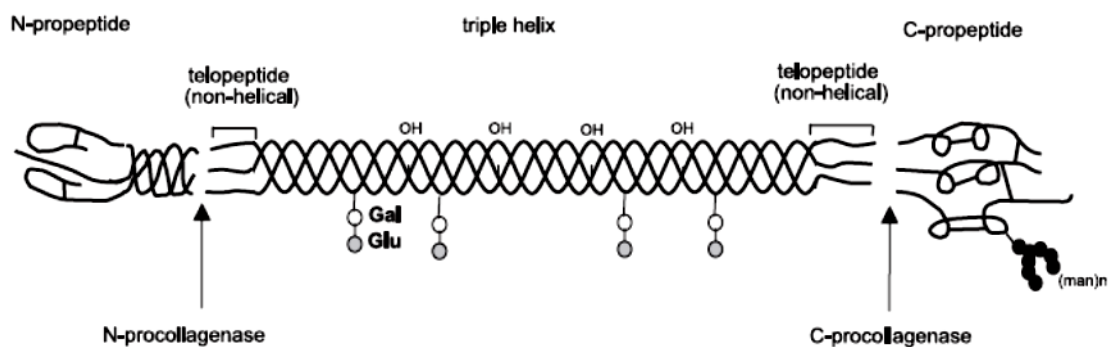
Kolagen tipa I prolazi kroz proces prirodne razgradnje zbog djelovanja enzima, a u ljudskoj koži ova je razgradnja izuzetno spor proces. Ljudi izlučuju samo četiri enzima koja mogu pokrenuti proces razgradnje kolagena tipa I (13). Ti enzimi su kolagenaze i pripadaju skupini enzima koji razgrađuju proteine matriksa i zovu se metaloproteaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP). MMP-ovi su odgovorni za fiziološku razgradnju raznih izvanstaničnih proteina matriksa. Pripadaju obitelji endopeptidaza ovisnih o cinku. Od četiri kolagenaze koje se izlučuju u ljudskom tijelu, samo je međustanična kolagenaza (MMP-1) uključena u proces normalnog obnavljanja kolagena u koži (14). Kad se veže za MMP-1, kolagen se razmotava. Razmotani lanac dalje razgrađuju ostali članovi obitelji MMP-a koji se zovu želatinaze. U zdravoj mladoj koži MMP-1 je prisutna u vrlo malim količinama. Želatinaze se također izlučuju u malim količinama u zdravoj koži (14, 15). Aktivnost MMP-a regulirana je osim na transkripcijskoj razini i endogenim inhibitorima metaloproteaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*, TIMP), prirodno sintetiziranim proteinima koji posebno inhibiraju MMP-ove (13). TIMP-ovi su glikoproteini male molekulske mase, inhibiraju aktivnost MMP-aza stvaranjem termostabilnih stehiometrijskih 1:1 kompleksa. Ti tkivni inhibitori metaloproteaza matriksa (TIMP-ovi) dalje usporavaju razgradnju kolagena

(16). Prema tome, kolagen tipa I u ljudskoj koži je vrlo stabilan i treba mu u prosjeku 30 godina da se obnovi (ponovi) (17).

### 1.1.2 STRUKTURA I FUNKCIJA KOLAGENA U DERMISU

Naziv "kolagen" koristi se kao generički izraz za proteine koji grade karakterističnu trostruku uzvojnica od tri polipeptidna lanca (12). Do sada je opisano 28 genetički odvojenih tipova kolagena, koji se označavaju rimskim brojevima.

Kolagen je najzastupljeniji protein u ljudskom tijelu, jer čini 30% njegove težine. Najvažnija je uloga strukturna, ali koži daje i otpor na istezanje, trajnost i čvrstoću (11). Različite tipove kolagena odlikuje značajna složenost i raznolikost strukture, prisustvo dodatnih nespiralnih domena, specifična strukturna organizacija i funkcija. Najbrojnija i najrasprostranjenija obitelj kolagena koja čini 90% ukupnog kolagena su kolageni koji formiraju vlakna (12).



**Slika 3.** Molekulska struktura kolagena tipa I (preuzeto iz (12)).

Svi kolageni imaju jednu zajedničku osobinu – desno orijentiranu trostruku uzvojnica sastavljenu od tri  $\alpha$ -lanca (slika 3). Nju formiraju ili tri identična lanca (homotrimeri) kao kod kolagena II, III, VII, VIII, X ili dva ili više različitih lanaca kao kod kolagena I, IV, V, VI, IX i

XI. Svaki od ova tri  $\alpha$ -lanca unutar molekule formira produženi lijevo orijentirani heliks sa po 18 amino kiselina po navoju.

Sva tri lanca su namotana nadesno oko centralne osi i čine trostruku uzvojnici. Da bi se mogli namotati mora postojati ostatak glicina, najmanje amino kiseline na svakoj trećoj poziciji polipeptidnog lanca što daje (Gly-X-Y)<sub>n</sub> ponovljenu strukturu koja je karakteristična za kolagenoznu domenu svih kolagena. Ostatak glicina se nalazi u centru trostruke uzvojnice, a veći lanci aminokiseline izvana. Ovo omogućava pakiranje oko centralne osi molekule. X i Y pozicije često zauzimaju prolin i hidroksiprolin.

Dužina trostruke uzvojnice varira značajno kod različitih tipova kolagena. Kod kolagena koji formiraju fibrile (I, II, III) predominantno je ponavljanje (Gly-X-Y) što daje dužinu od 300 nm ili oko 1000 amino kiselina. Važne su i nekolagenozne domene na krajevima uzvojnice. Tako se za C-propeptid smatra da igra glavnu ulogu u inicijaciji formiranja trostruke uzvojnice, a N-propeptid da je vezan za regulaciju primarnih promjera vlakana (slika 3) (12). Kratki telopeptidi uključeni su u kovalentno umrežavanje kolagenskih molekula kao i umrežavanje s drugim molekulama izvanstaničnog matriksa.

#### RASPROSTRANJENOST, STRUKTURA I FUNKCIJA RAZLIČITIH TIPOVA KOLAGENA

Na osnovu njihove strukture i funkcije mogu se razvrstati u nekoliko skupina. Fibrilarni ili vlaknasti kolageni su kolageni tipa I, II, III, V i XI. Molekule ove skupine kolagena međusobno se udružuju u vlakanca koja se vide elektronskim mikroskopom. Kolagen tipa I količinski prevladava i rasprostranjen je svuda u tijelu i najbolje je proučen. U tkivima se javlja u obliku kolagenih vlakana, a nalazi se kostima, dentinu, tetivama, čahurama organa i vezivnom tkivu kože. Trostruka uzvojnica kolagena tipa I se obično formira kao heterotrimer od dva indentična  $\alpha 1(I)$ -lanca i jednog  $\alpha 2(I)$ -lanca (11, 12). Kolageni koji su udruženi s vlaknastim

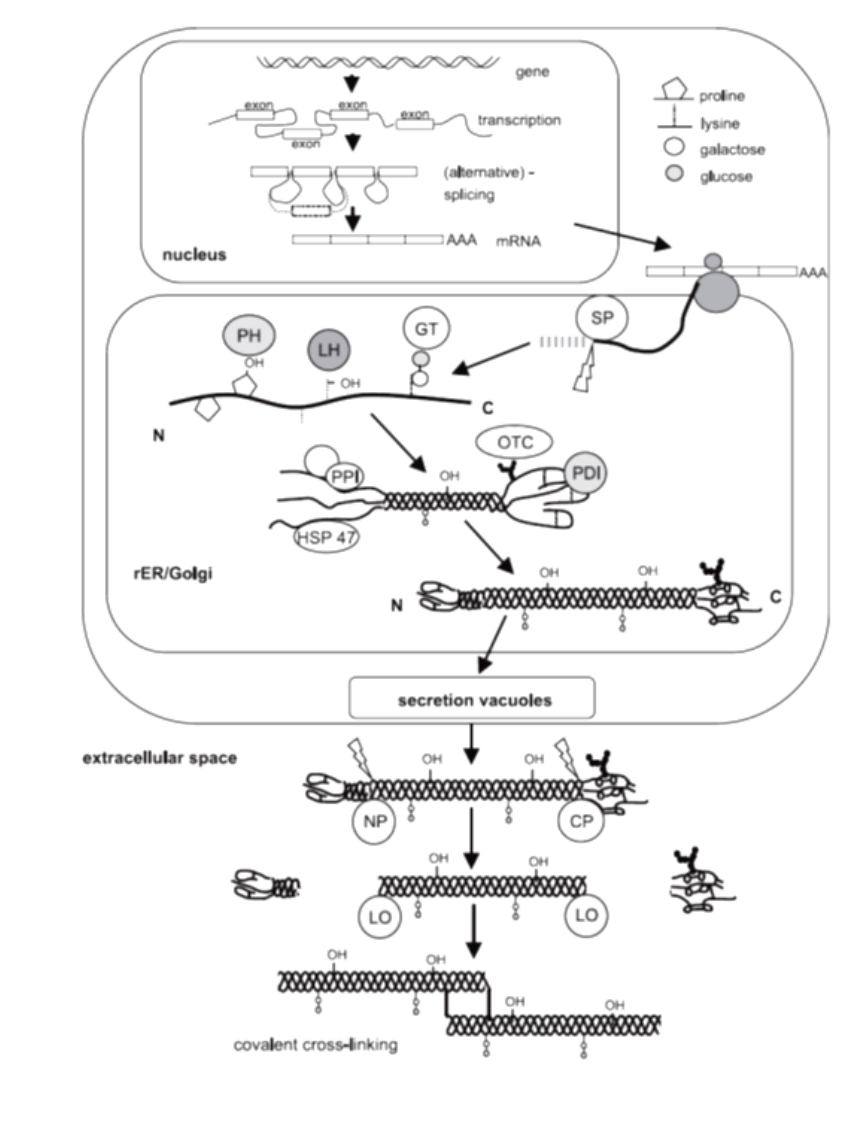
kolagenima su kratke kolagenske molekule koje sudjeluju u povezivanju vlaknastih kolagena međusobno, kao i s ostalim sastavnicama izvanstaničnog matriksa. To su kolageni tipa IX, XII i XIV.

Kolageni koji formiraju mrežu su molekule kolageni tipa IV koji se udružuju u mrežu i čine osnovni strukturni element bazalne lamine (11). Kolagen koji izgrađuje sidrena vlakna je kolagen tipa VII koji izgrađuje sidrena vlakanca koja povezuju kolagenska vlakna s bazalnom laminom (11).

### 1.1.3 BIOSINTEZA I METABOLIZAM KOLAGENA

#### BIOSINTEZA KOLAGENA

Biosinteza kolagena je složen proces koji se odvija u nekoliko faza (12). Budući da je kolagen tipa I najrasprostranjeniji u ljudskom tijelu, njegova je biosinteza detaljno proučena.



**Slika 4.** Shematski prikaz biosinteze kolagena tipa I (preuzeto iz (12))

Biosinteza kolagena počinje sa transkripcijom gena u staničnoj jezgri, procesiranjem glasničke RNA, a zatim se pojedinačni polipeptidni  $\alpha$ -lanci sintetiziraju na hrapavom endoplazmatskom retikulumu kao prekursora molekula preprokolagen (slika 4). Nakon što



signalna peptidaza ukloni signalni peptid, molekule prokolagena prolaze kroz nekoliko koraka post-translacijskih modifikacija. Hidroksiliranje ostatka prolina i lizina kataliziraju prolil 3-hidroksilaza, prolil 4-hidroksilaza i lizil hidroksilaza. Ovi enzimi zahtijevaju ione željeza, 2-oksoglutarata, molekularni kisik i askorbinsku kiselinu (vitamin C) kao kofaktore. Ostaci hidroksilizina formiraju stabilne intermolekulske unakrsne veze molekula kolagena u vlaknima, a pored toga predstavljaju mjesta za vezanje ugljikohidratnih jedinica. Nakon hidroksiliranja slijedi glikoziliranje hidroksilizina. Ostaci glukoze i galaktoze se premještaju u hidroksilne grupe hidroksilizina, a u toj katalizi sudjeluju enzimi galaktozil-transferaza i glukozil-transferaza. C-propeptidi imaju glavnu ulogu u spajanju tri  $\alpha$ -lanca u trimeričke monomere kolagena. Globularnu strukturu C-propeptida stabiliziraju međulančane disulfidne veze. Formiranju trostruke uzvojnice prethodi poravnavanje C-terminalnih domena tri  $\alpha$ -lanca. Proces teče prema N-terminusu. Nastanak i smatanje prokolagenskih lanaca ovisi o prisustvu enzima kao što je peptidil-prolil *cis-trans*-izomeraza te kolagen specifičnim šaperonima kao HSP47.

## IZLUČIVANJE KOLAGENA

Nakon procesiranja i spajanja prokolagena, molekule trostruke uzvojnice se pakiraju unutar Golgijevog odjeljka u sekretorne vezikule i izlučuju u međustanični prostor. Nakon izlučivanja trimeri prokolagena se procesiraju ovisno o tipu kolagena. C-propeptid i N-propeptid otcjepljuju s molekule prokolagena dvije određene proteaze, prokolagen N-proteaza i prokolagen C-proteaza (slika 4). Oba proteina pripadaju obitelji  $Zn^{2+}$  ovisnih metaloproteaza. Nastaje molekula tropokolagen.

## IZVANSTANIČNO PROCESIRANJE I MODIFIKACIJA

U izvanstaničnom prostoru tropokolagenska vlakna se udružuju u kolagenska vlakna. Sposobnost spontanog udruživanja je kodirana u strukturi kolagena. Hidrofobnim i elektrostatskim interakcijama dolazi do nastanka vlakana. Organizacija kolagenskih vlakana odražava funkcionalne potrebe tkiva, a u koži kolagenska vlakna su nasumično organizirana u složenu mrežu isprepletenih vlakana. Nadalje, nastanak vlakana kontroliraju prokolagen-peptidaze otcjepljujući propeptidne sekvence prokolagena. Tako je otcjepljivanje C-propeptida kolagena tipa I ključni korak u regulaciji nastanka vlakana.

Vlakna se dodatno stabiliziraju kovalentnim unakrsnim vezama koji pridonose mehaničkoj otpornosti zrelih vlakana kolagena. Enzim lizil-oksidaza ovisna o bakru katalizira formiranje aldehida iz ostataka lizina i hidroksilizina u telopeptidima. Zatim spontanijama reakcijama stvaraju se unakrsne veze. Unakrsne veze se stvaraju između glave jedne i repa druge tropokolagenske molekule.

Ove intermolekulske unakrsne veze su preduvjet za fizičke i mehaničke osobine kolagenskih vlakana i nastanak stabilne mreže.

## 1.2 REMODELIRANJE DERMISA USLIJED STARENJA: POSLJEDICE NA STRUKTURU I FUNKCIJU KOŽE

Promjene koje se starenjem javljaju u dermisu na molekulskoj, staničnoj i morfološkoj razini utječu na funkciju i strukturu kože (9, 18, 19). Dermis starenjem postaje rigidan i neelastičan čime se umanjuje sposobnost odgovora kože na mehanički stres. Uz važnost tih promjena za zdravlje čovjeka, promjene u dermisu značajno utječu na izgled što može imati veliki estetski i psihosocijalni utjecaj.

Za razliku od kronološkog ili intrinzičnog starenja koje ovisi od tijeku vremena i na kojeg utječu genetski faktori, fotostarenje ovisi uglavnom od stupnja izlaganja suncu i pigmentaciji kože (4, 6, 20). Fotostarenje, izraz koji je 1989. godine uveo Kligman (21), je kombinacija oštećenja vanjskih slojeva kože (epidermisa) zbog djelovanja kratkovalnog UVB zračenja i srednjih slojeva kože (dermisa) zbog djelovanja UVA zračenja dugih valnih duljina (22). Tvrdi se da je oko 80% - 90% vidljivih znakova starenja posljedica kumulativnog izlaganja sunčanoj svjetlosti (23, 24). Posljednjih godina i utjecaj infracrvenog zračenja na starenje kože dobiva sve više na značaju (25, 26).

Iako intrinzički ostarjela i fotoostarjela koža dijele zajedničke karakteristike u vidu bora, krutosti i neelastičnosti kože, intenzitet tih promjena, nastup te progresija su značajno izraženiji izlaganjem sunčevom zračenju.

Oba starenja su procesi koji su povezani sa fenotipskim promjenama u stanicama kože, ali se glavne strukturne i funkcijske promjene događaju u dermalnom izvanstaničnom matriksu (9). Izuzetna dugovječnost proteina izvanstaničnog matriksa, izlaže te molekule akumuliranim oštećenjima, koja zatim utječu na njihovu sposobnost da osiguraju mehaničku čvrstoću i posredovanje u homeostazi tkiva (27, 28).

Remodeliranje dermalnog izvanstaničnog matriksa je očigledno i kod kože izložene UV zračenju i kod zaštićene kože, ali ih karakteriziraju različiti procesi remodeliranja (slika 5) (9). Dermalni kolagen, elastin, glikozaminoglikani i proteoglikani prolaze kroz značajno, ali međusobno različito remodeliranje u fotozaštićenoj i suncu-izloženoj ostarjeloj koži. U kronološki ostarjeloj koži dolazi do razgradnje kolagena tipa I, III i IV te elastina i oksitalan vlakana koja sadrže fibrilin (29), ali i do značajnog gubitka glikozaminoglikana (7, 30, 31). Nasuprot općoj atrofiji izvanstaničnog matriksa dermisa kronološki ostarjele kože, fotoostarjelu kožu karakteriziraju katabolički i anabolički procesi remodeliranja koji ovise o tipu sastavnice, lokaciji i dozi ultraljubičastog zračenja.

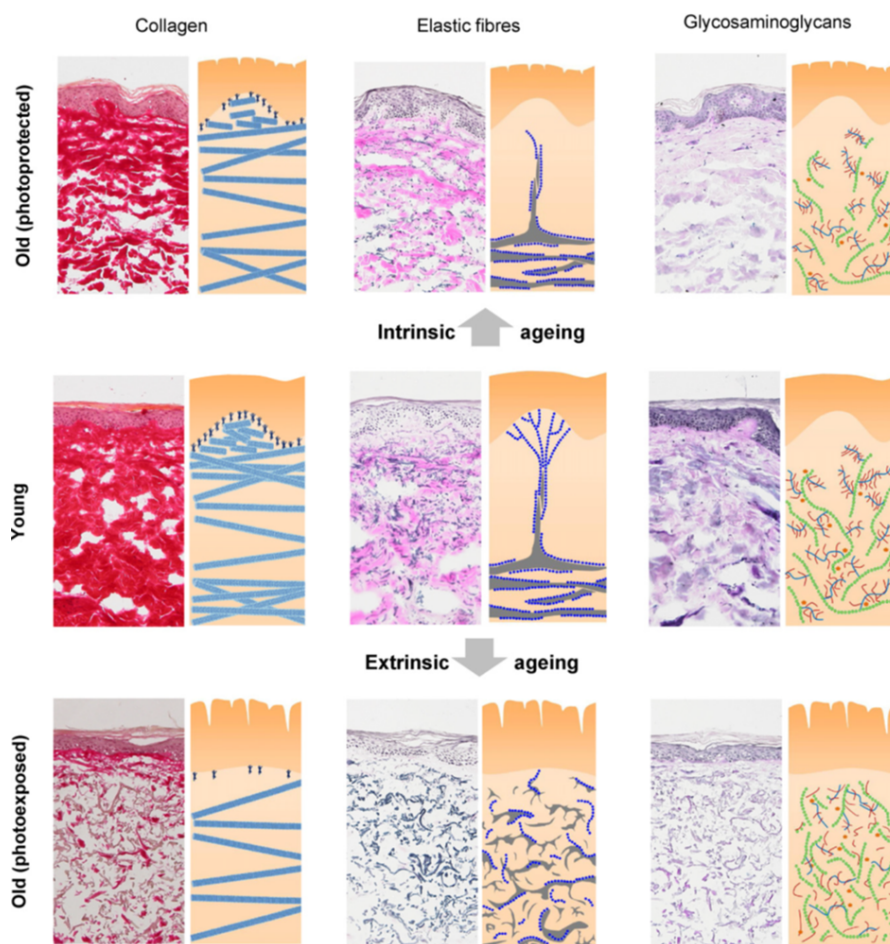
Kronološkim starenjem sadržaj kolagena smanjuje se za oko 2% godišnje, prvenstveno zbog povećane razgradnje posredovane MMP-ovima. Razgradnjom kolagena narušava se strukturalni integritet dermisa. Nadalje, mehanička napetost koju stvara zdravi kolagenski matriks je ključna za održavanje potrebne ravnoteže između sinteze i razgradnje kolagena. Dolazi i do kolapsa fibroblasta zbog nakupljanja oštećenog/razgrađenog kolagena što onemogućuje održavanje zdravog kolagenskog matriksa. Time se smanjuje i proizvodnja kolagena, a ravnoteža se još više pomiče u smjeru razgradnje kolagena. Omjer različitih tipova kolagena također se mijenja tijekom starenja te se primjerice značajno smanjuje odnos kolagena tipa I prema kolagenu tipa III zbog selektivno izraženijeg gubitka kolagena tipa I (32). Starenjem kolagenska vlakna postaju deblja, a organizacija kolagenskih snopova manje uređena (33). Unakrsne veze se stabiliziraju dodatno smanjujući elastičnost kože (7).

Atrofija dermalnog kolagenskog matriksa još je više izražena kod fotoostarjele kože s značajno većim smanjenjem fibrilarnog kolagena (29, 34), ali i gubitka kolagen VII sidrenih fibrila u dermalno-epidermalnoj vezi (35). Fotoostarjela koža ima statistički značajno manje

(20%) kolagena nego zaštićena koža (36-38). Dezorganizacija kolagenskog matriksa je obično jače izražena u fotoostarjeloj koži nego u kronološki ostarjeloj koži (22).

Kronološkim starenjem smanjuje se sadržaj funkcionalnog elastina zbog kalcifikacije elastina te razgradnje elastičnih vlakana (7). Također dolazi i do smanjenja sinteze elastina (39). Specifičan je gubitak mikrofibrila bogatih fibrilinom koji formiraju vlakna oksitalana u dermalno-epidermalnoj vezi. Tijekom ranog stadija fotostarenja također dolazi do gubitka mikrofibrila bogatih fibrilinom u dermalno-epidermalnoj vezi (40, 41), dok u jako oštećenoj koži dolazi do akumulacije neorganiziranih proteina elastičnih vlakana u retikularnom dermisu. U kasnijim fazama fotostarenja dolazi do akumulacije neorganiziranih oštećenih elastičnih vlakana u cijelom dermisu što je proces koji se naziva dermalna elastoza (9). Često dolazi i do infiltracije upalnih stanica u dermisu (2).

Sadržaj glikozaminoglikana, koji značajno doprinose strukturi dermisa te osiguravaju zadržavanje vode, smanjuje se kronološkim starenjem (30). Tako se smanjuje količina hijaluronske kiseline, ali i ostalih glikozaminoglikana koji čine osnovnu tvar vezivnog tkiva. Nasuprot tome, početno pri fotostarenju dolazi do povećanja sadržaja hijaluronske kiseline i glikozaminoglikana koji sadrže kondroitin sulfat te do njihove redistribucije kako bi kolokalizirali s elastičnim vlaknima (42). Mreža glikozaminoglikana je različito modelirana u umjereno i jako oštećenoj koži (9). U konačnici, u fotoostarjeloj koži glikozaminoglikani nagomilavaju se u neorganizirane agregate (42).

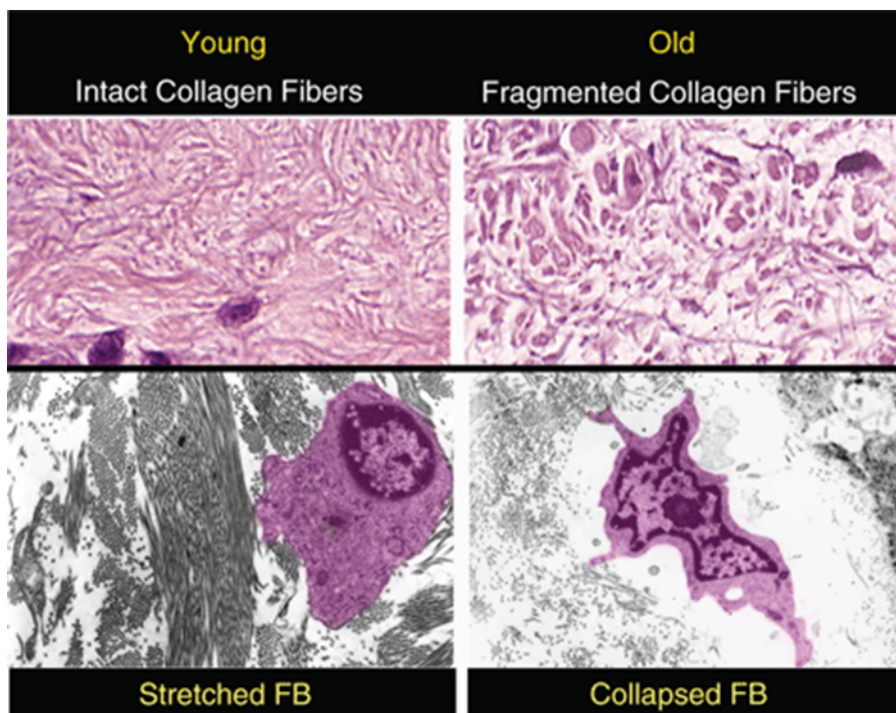


**Slika 5.** Remodeliranje izvanstaničnog matriksa u kronološki i fotoostarjeloj koži (preuzeto iz (9)). Tijekom starenja dolazi do značajnog, ali različitog remodeliranja kolagenskog, elastičnog i glikozaminoglikanskog matriksa u fotozaštićenoj i fotonezaštićenoj koži. Mlada koža na slici odnosi se na kožu nadlaktice osobe stare 23 godine, a ostarjela fotozaštićena i fotonezaštićena koža na kožu stražnjice i kožu podlaktice osobe stare 75 godina. Dok je atrofija dermalnih kolagena uočljiva u kronološki ostarjeloj koži, u fotoostarjeloj koži uočavamo značajno smanjenje količine kolagenskih vlakana te specifični gubitak kolagena tipa VII iz dermalno-epidermalne veze. U fotozaštićenoj koži dolazi do specifične razgradnje mikrofibrila koja čine oksitalan vlakna u dermalno-epidermalnoj vezi. Kasni stadij fotostarenja karakterizira nakupljanje neorganiziranih proteina elastičnih vlakana u dermisu (solarna elastoza). U fotozaštićenoj koži dolazi do gubitka glikozaminoglikana, a u fotooštećenoj do nakupljanja u neorganizirane agregate.

### 1.3 HISTOLOŠKI I KLINIČKI IZGLED KRONOLOŠKI OSTARJELE I FOTOOSTARJELE KOŽE

Mlada koža je zategnuta, glatka, bez bora, hidratizirana te ujednačene boje (43). Kolagenska vlakna u dermisu su intaktna i organizirana. Fibroblasti su “rastegnuti” i nalaze se u

neposrednoj blizini kolagenskih vlakana s vidljivim endoplazmatskim retikulumom u citoplazmi što ukazuje na aktivnu sintezu proteina (slika 6) (43).



**Slika 6.** Histološka razlika mlade i ostarjele kože (preuzeto iz (43)).

Histološki, najkonzistentnija promjena kod prirodnog starenja kože je stanjivanje dermalno-epidermalne veze (2), opća atrofija izvanstaničnog matriksa, koja se očituje u smanjenom broju fibroblasta te gubitku njihovog dodira s kolagenskim vlaknima (“propali fibroblasti”) (6, 29, 43, 44).



**Slika 7.** Kliničke značajke mlade, stare i fotoostarjele kože (preuzeto iz (45)). Na slici gore su prikazane ruke 23-godišnje žene (gore lijevo) bez ikakvih znakova fotostarenja, 46-godišnje žene (gore desno) sa lentigom i sitnim borama, 61-godišnje žene (dolje desno) sa lentigom i borama i 83-godišnje žene (dolje lijevo) sa lentigom, dubokim borama i atrofijom.

Intrinzično ili kronološki ostarjela koža je suha, stanjena, providna, smanjene elastičnosti, sa finim borama (46, 47), određenim brojem dobroćudnih neoplazmi (2) te ravnomjernije pigmentirana (47).

Bore u kronološki ostarjeloj koži klasificiraju se prema Fitzpatrickovom skoru (48).

Tablica 1. Klasifikacija bora u kronološki ostarjeloj koži klasificiraju prema Fitzpatrickovom skoru

Fitzpatrick skor za bore			
Razred	Skor	Izboranost	Stupanj elastoze
I	1–3	Fine bore	Blag (fine promjene u teksturi sa slabo naznačenim crtama na koži)
II	4–6	Fine bore do bora umjerene dubine, umjeren broj bora	Umjeren (jasna elastoza, sa žućkastom providnošću pod direktnim svjetlom)
III	7–9	Fine do duboke bore, mnogo bora sa ili bez nabora kože	Znatan (multipapularna i konfluentna elastoza (žućkasta zadebljanja i bljedoća) koja se približava ili već jest u stanju cutis rhomboidalis)



Fotoostarjela koža ima jasno vidljive promjene kao duboke i jako naglašene bore, zadebljan i grub, naboran izgled, s vidljivim gubitkom elastičnosti (49) te neujednačenom pigmentacijom (50), prisustvo amornog elastotičnog materijala (51), telangiektazija i raznih benignih, premalignih i malignih neoplazmi (46).

Fotostarjela koža se klasificira prema Glogau skor (52) i stupnju izboranosti na:

- Blago ostarjela (28-35 godina): malo bora, nema keratoza
- Umjereno ostarjela (35-50 godina): rane bore, upala koža lica sa ranim aktinskim keratozama
- Uznapredovalo ostarjela (50-60 godina): izražene bore, gubitak pigmentacije sa telangiektazijom i aktinskim keratozama
- Ozbiljno ostarjela (65 – 70 godina): puno bora, fotostarenje, gravitacijski i dinamički utjecaji na kožu, aktinske keratoze sa ili bez karcinoma kože (slika 8).



**Slika 8.** Glogau skor za fotoostarjelu kožu: a) malo bora, bez keratoza, b) rane bore c) izražene bore i gubitak pigmentacije, d) puno bora, fotooštećenje i koža koja visi (preuzeto iz (22)).

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Gubitak stukturalnog integriteta dermisa rezultira povećanom rigidnošću, smanjenom rastezljivošću i umanjenom elastičnošću kože, a te promjene brže se javljaju kod žena (53) s istovremenim porastom povredljivosti kože.

Cilj predloženog specijalističkog rada je pregledno opisati i kritički raspraviti nove spoznaje povezane s degenerativnim promjenama fibroblasta i kolagena kao ključnog mehanizma kronološkog i fotostarenja kože. Poseban naglasak bit će stavljen na biološki aktivne tvari te pripravke koji se koriste ili ispituju u svrhu preveniranja i/ili usporavanja takvih degenerativnih promjena.

### 3 SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Pretraživanje literature obavljeno je elektroničkim putem, a pretražena je baza podataka PubMed. Kao osnovna literatura i ključan izvor podataka o znanstvenim studijama vezanim uz starenje općenito korišteni su pregledni članci objavljeni u časopisu Nature Reviews Molecular Cell Biology.

Izvor znanstvenih studija vezanim uz starenje kože poslužili su najviše znanstveni članci objavljeni u časopisima Journal of Investigative Dermatology i American Journal of Pathology. Izvor znanstvenih studija vezanim uz biološki aktivne tvari za preveniranje i usporavanje degenerativnih promjena poslužili su radovi u časopisu International Journal of Cosmetic Science.

Relevantni znanstveni radovi proučavani su analitično i kritično s obzirom na: (i) definiranje znanstvenog problema, (ii) prikaz postojećih znanja o definiranom problemu, (iii) pregled objavljenih eksperimentalnih studija vezanih za istraživanu temu, (iv) prikaz i analizu rezultata te (v) izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci, koji su prikazani ovim radom. Na temelju proučavanih znanstvenih radova izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike.

## 4 RASPRAVA

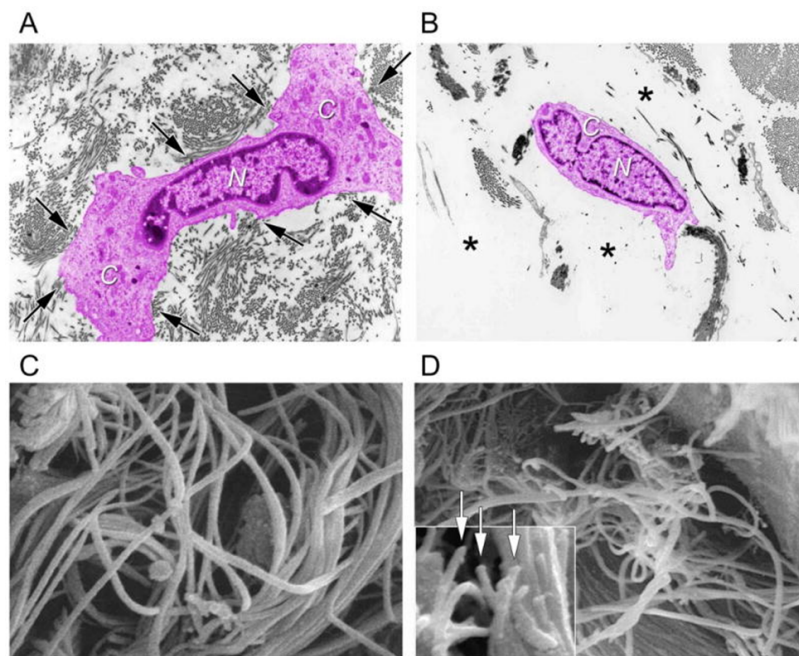
### 4.1 DEGENERATIVNE PROMJENE KOLAGENSKOG MATRIKSA U OSNOVI KRONOLOŠKOG STARENJA

U organizaciji i održavanju kolagenskog matriksa ključnu ulogu igra mehanička napetost koju osiguravaju fibroblasti odgovorni za sintezu kolagena (4, 54). Smanjenje mehaničke napetosti koje se javlja starenjem je kritična pokretačka sila molekularnih promjena u podlozi starenja kože (4). Fizička svojstva kolagenskih vlakana određuju funkciju fibroblasta i obrnuto. Smatra se da su dva svojstva kolagenskih vlakana uvelike odgovorna za narušavanje strukturalnog integriteta ostarjele kože: (i) vrlo dugo vrijeme poluživota kolagena koje je procijenjeno na oko 15 godina (17), i (ii) intra- i intermolekulske veze otporne na razgradnju (55, 56). Kolagen se jako sporo razgrađuje te tijekom starenja dolazi do nakupljanja djelomično razgrađenog/fragmentiranog kolagena što ne samo da narušava integritet kolagenskog matriksa već narušava i funkciju fibroblasta.

#### 4.1.1 NAKUPLJANJE FRAGMENTIRANOG KOLAGENA I GUBITAK MEHANIČKE NAPETOSTI TIJEKOM STARENJA

Kolagen tipa I u koži je vrlo stabilan; potrebno je otprilike 30 godine za njegovu obnovu (17). Posljedica sporog obnavljanja kolagena je nakupljanje vremenski stečenih modifikacija koje onemogućavaju njegovu normalnu funkciju. U te modifikacije spadaju i nove unakrsne veze u koje su uključeni ugljikohidrati ostatci (57). Te se veze ne mogu lako razgraditi djelovanjem MMP-ova i zbog toga starenjem dolazi do nakupljanja fragmentiranog kolagena unutar izvanstaničnog matriksa (58). Unakrsne veze sprječavaju potpuno uklanjanje fragmenata kolagena. Ti fragmenti se ne mogu popraviti niti ugraditi u nova vlakna kolagena i zato dolazi

do nepravilnosti u trodimenzionalnom kolagenskom matriksu. Nakupljanje fragmentiranog kolagena leži u osnovi promjena u izgledu ljudske kože koje se javljaju starenjem (4).



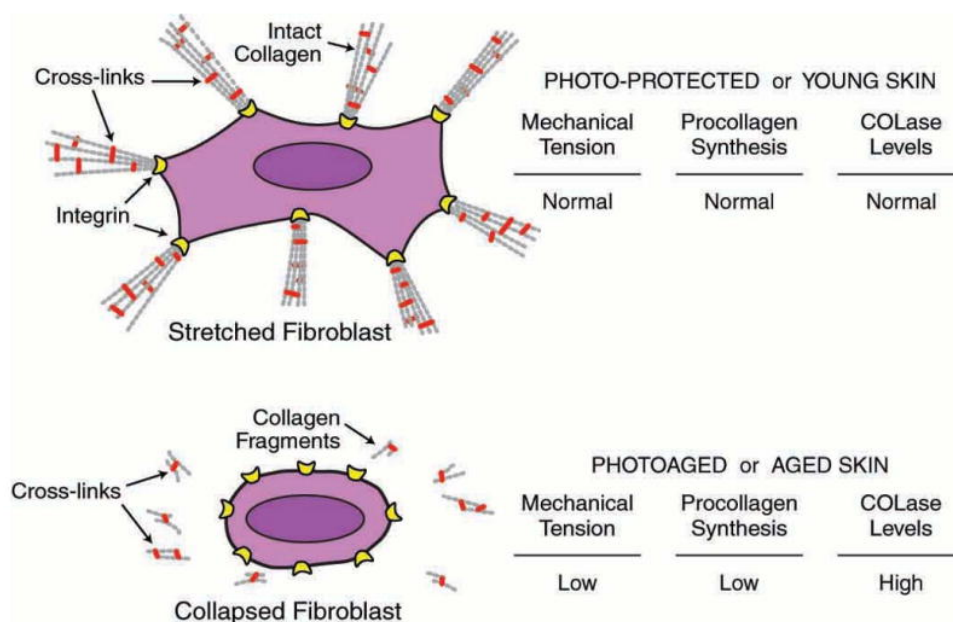
**Slika 9.** Fragmentacija vlakana kolagena u dermisu stare/fotooštećene kože. Mikrografija fibroblasta (umjetno obojanih u ružičastu boju zbog jasnoće prikaza) mlade kože zaštićene od sunca (A) i dermisa fotooštećene ljudske kože (B). Mikrografija vlakana kolagena u mladoj ljudskoj koži (C) i u fotooštećenoj ljudskoj koži (D) (preuzeto iz (4)).

Fibroblasti su razvojno programirani za sintezu kolagena i ostalih proteina međustaničnog matriksa na osnovu mehaničke napetosti (4). Fibroblasti se integrinima, receptorima na svojoj površini, pričvršćuju za proteine izvanstaničnog matriksa posebice kolagen tipa I. Vezanjem na matriks dolazi do grupiranja integrina i nastajanja kompleksa s aktinskim citoskeletom (59). Povezivanjem izvanstaničnog matriksa i citoskeletona nastaju žarišne adhezije koje karakterizira neraskidivo povezana regulatorna i mehanička funkcija. Nastanak žarišnih adhezija aktivira signalne kaskade kojima se regulira metabolizam fibroblasta uključujući i ravnotežu između proizvodnje kolagena tipa I i njegove razgradnje djelovanjem MMP-ova. Pričvršćivanjem na izvanstanični matriks omogućeno je rastezanje fibroblasta što im je neophodno za rast, preživljavanje i normalnu funkciju (60). Fibroblasti pomoću

citoskeletne mašinerije (mikrofilamenta), koja se nalazi na unutarnjoj strani stanične membrane i u citoplazmi, a fizički je spregnuta s integrinima, povlače mrežu kolagenskih vlakana (61). Strukturne osobine netaknute kolagenske mreže u mladoj koži odupiru se tom povlačenju čime se stvara mehanička napetost između fibroblasta i kolagenskog matriksa. Unutrašnje povlačenje aktin-miozin mikrofilamenta potpomaže stvaranje unutarstanične mreže (mikrocijevčice i međufilamenti) čime se osigurava rastegnutost stanice. Oblik fibroblasta (tj. koliko će on biti rastegnut) i funkcija određeni su mehaničkom napetošću između kolagenskog matriksa i stanice (54, 62, 63).

#### 4.1.2 NARUŠENA RAVNOTEŽA IZMEĐU PROIZVODNJE I RAZGRADNJE KOLAGENA TIJEKOM STARENJA

Smanjenje mehaničke napetosti koje se javlja starenjem kritična je pokretačka sila molekularnih promjena u podlozi starenja kože (slika 10) (4). Neposredna je posljedica fragmentacije kolagena karakteristične za proces starenja (64, 65). Smanjenjem mehaničke napetosti fibroblasti gube na svojoj raztegnutosti čime se pomiče ravnoteža između sinteze i razgradnje kolagena u smjeru razgradnje (3, 65, 66).

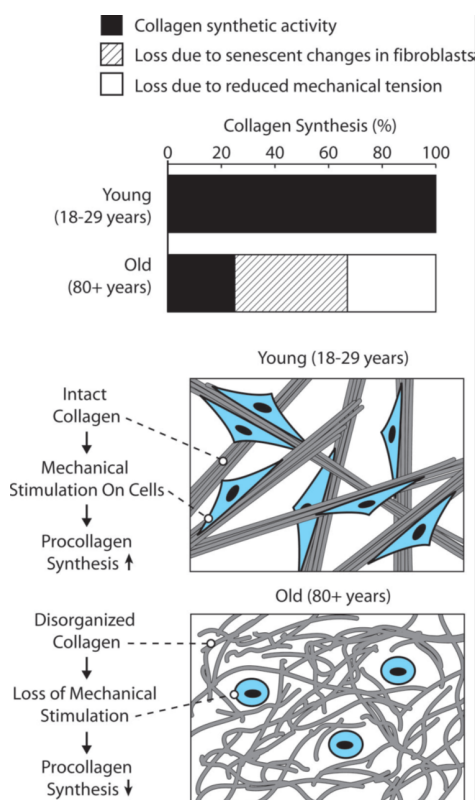


**Slika 10.** Model koji odražava vezu između mehaničke napetosti te proizvodnje i razgradnje kolagena u ljudskoj koži (preuzeto iz (4)).

Fragmentacijom kolagena gube se vezna mjesta za integrine te time sposobnost kolagenskih vlakana u pružanju mehaničkog otpora citoskeletalnim kontrakcijskim silama fibroblasta. U izostanku vezanja za kolagenska vlakna, ne dolazi do nastanka žaričnih adhezija te izostaje organizacija mikrotubula, a rezultat čega je urušavanje fibroblasta. Takvi fibroblasti proizvode manje prokolagena, a više MMP-ova (3, 15, 65, 66). Smanjenja proizvodnja kolagena i povećana razgradnja kolagena posredovana MMP-ovima dodatno smanjuje mehaničku napetost čime se dalje potiču degenerativne promjene u dermisu (4).

Kao još jedan čimbenik koji pridonosi smanjenju sinteze kolagena kod kronološkog starenja predlaže se starenje staničnih fibroblasta. *In vitro* istraživanja ukazuju na to da smanjena sinteza kolagena u staroj koži odražava, barem dijelom, smanjenje aktivnosti u sintezi kolagena u rezidentnoj populaciji fibroblasta (65). Proizvodnja kolagena u koži starijih osoba (80 i više godina) smanjuje za oko 75% u odnosu na kožu mladih osoba (18 do 29 godina) (67). Morfometričkom analizom utvrđeno je da se broj fibroblasta u ostarjeloj koži smanjuje

za oko 35%. Ako se broj fibroblasta u staroj koži smanji za oko 35%, a sinteza prokolagena tipa I u preostalim fibroblastima smanji za oko 30%, može se izvesti zaključak da smanjenje biosintetičkoj aktivnosti fibroblasta sudjeluju sa oko 45% u ukupnom smanjenju proizvodnje kolagena koje se javlja starenjem. Ostali faktori (uključujući i gubitak mehaničke napetosti) sudjeluju sa preostalih 30% (slika 11) (65).



**Slika 11.** Shematski prikaz mehanizma smanjene sinteze kolagena u ostarjeloj koži (preuzeto iz (65)).



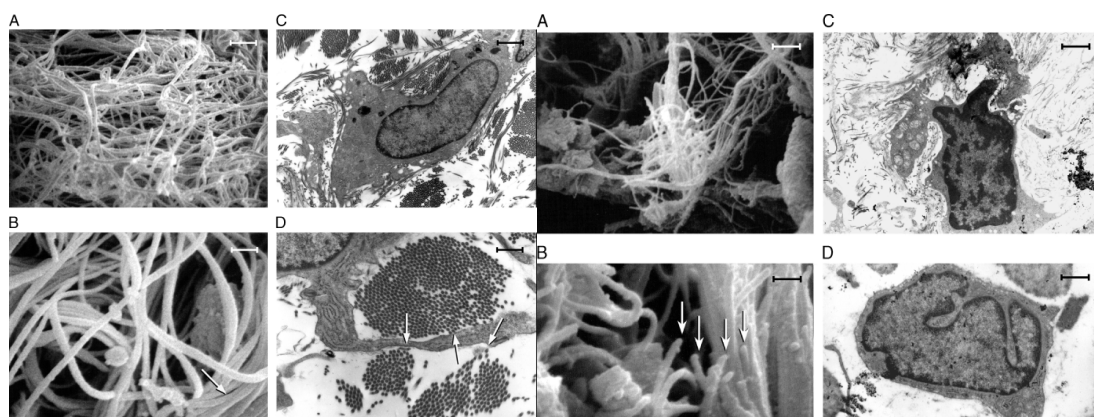
#### 4.2 DEGENERATIVNE PROMJENE KOLAGENSKOG MATRIKSA U OSNOVI FOTOSTARENJA

Oštećenje fibrilarnog kolagena je među glavnim značajkama fotooštećene kože (51). Izlaganjem sunčevom UV zračenju dolazi do povećane ekspresije MMP-a (14). Fragmentacija kolagena u fotooštećenoj koži je vjerovatno posljedica ponavljane indukcije tih enzima izlaganjem sunčevom UV zračenju tijekom godina ili desetljeća. Iako je nesumljivo propadanje postojećeg kolagena glavni uzrok degenerativnih promjena kolagenskog matriksa u osnovi fotostarenja, njima značajno pridonosi i nemogućnost zamjene oštećenih vlakana novosintetiziranim vlaknima. U fotooštećenoj koži zabilježeno je značajno smanjenje sinteze kolagena u usporedbi s fotozaštićenom kožom (34). Mehanizmi u osnovi smanjenja sinteze kolagena nisu u potpunosti razjašnjeni. Kao glavni mehanizam predlaže se gubitak mehaničke napetosti koji je u fotooštećenoj koži više izražen zbog izraženijih degenerativnih promjena kolagenskih vlakana (3, 64). Intrinzičke promjene fibroblasta izgleda nemaju značajan doprinos jer fibroblasti izolirani iz fotooštećene kože u kulturi ne pokazuju razlike u sposobnosti proizvodnje kolagena u usporedbi s fibroblastima odgovarajuće fotozaštićene kože (66).

Fotostarenje je moguće okarakterizirati kao ubrzano kronološko starenje. Ubrzanje se događa jer UV zračenje akutno potiče ekspresiju MMP-a i smanjuje proizvodnju kolagena (14, 15). Tako UV zračenje, kao i kronološko starenje narušava ravnotežu u korist razgradnje kolagena. Negativni utjecaj UV zračenja na metabolizam kolagena može biti poprilično dramatičan. Umjereno izlaganje UV zračenju koje izaziva blago crvenilo kože, ali ne i opekotine od sunca povećava razinu MMP-a nekoliko stotina puta u usporedbi sa zaštićenom kožom (14). UV zračenje istovremeno smanjuje proizvodnju kolagena za oko 80% (15). Ove promjene događaju se u roku od 24 sata od izlaganja suncu i vraćaju se na

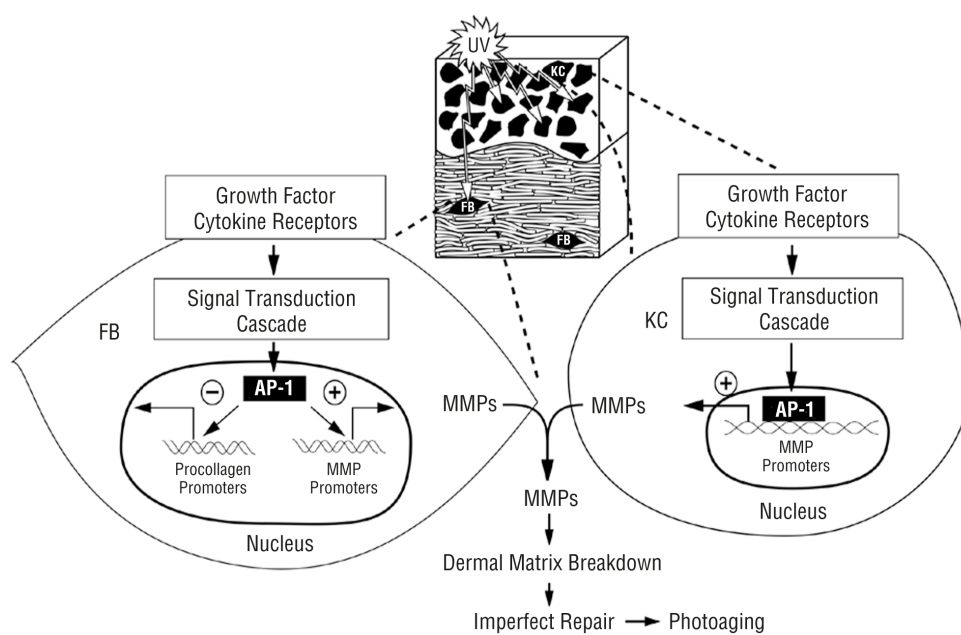
normalne vrijednosti u sljedećih 48 – 72 sata. Međutim, svakodnevno minimalno do umjereno izlaganje suncu održava razinu MMP-a i suspreže proizvodnju kolagena za vrijeme čitavog izlaganja (15).

UV zračenje pokreće složeni niz specifičnih molekularnih odgovora koji dovode do degenerativnih promjena kolagenskog matriksa.



**Slika 12.** Ultrastrukturalne osobine zaštićene kože (lijevo) i fotooštećene kože (desno) (preuzeto iz (3)).

Osim što aktivira MMP-aze, UV zračenje aktivira citokine na površini stanice i receptore faktora rasta. Receptori epidermalnih faktora rasta (EGF), interleukina (IL) 1 i faktor tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aktiviraju se u roku od 15 min u ljudskoj koži *in vivo*, a maksimalna aktivacija postiže se u okviru od 4 sata nakon izlaganja UV zračenju (68). Aktivirani receptori pobuđuju transdukcijske signalne kaskade koje induciraju transkripcijski faktor AP-1 koji potiče transkripciju gena MMP-a (MMP-1, MMP-3 i MMP-9), ali i inhibira ekspresiju gena prokolagena (slika 13).



**Slika 13.** Model oštećenja dermisa UV zračenjem (preuzeto iz (6)). UV zračenje (valovite strelice) aktivira faktore rasta i receptore citokina na površini keratinocita (KC) i fibroblasta (FB).

### 4.3 DRUGI STANIČNI I MOLEKULSKI MEHANIZMI STARENJA

Glavnim uzrokom starenja smatra se nakupljanje staničnih oštećenja tijekom vremena. Međutim, postavljaju se kritična pitanja o fiziološkim uzrocima koji uzrokuju oštećenja, kompenzacijskih odgovorima koji se javljaju kako bi se ponovno uspostavila homeostaza, međusobnoj povezanosti između različitih vrsta oštećenja i kompenzacijskih odgovora, a i o mogućnosti farmakološke/dermatokozmetičke intervencije s ciljem odgađanja ili usporavanja starenja. Predloženo je devet glavnih promjena koje se javljaju starenjem na staničnoj i molekulskoj razini (69). Svaka promjena idealno bi trebala ispuniti sljedeće kriterije: (1) očitovati se tijekom normalnog starenja; (2) eksperimentalno pogoršanje trebalo bi ubrzati starenje; i (3) eksperimentalno poboljšanje trebao bi usporiti starenje i time produljiti zdrav životni vijek.

#### 4.3.1 GENOMSKA NESTABILNOST

Zajednički nazivnik starenja je akumulacija genetskog oštećenja tijekom života. Integritet i stabilnost DNA kontinuirano je ugrožen od strane egzogenih fizičkih, kemijskih i bioloških agensa, kao i od strane endogenih prijetnji, uključujući pogreške pri replikaciji DNA, spontanijih reakcija hidrolize i reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (70). Genetske promjene koje proizlaze iz ekstrinzičnih ili unutarnjih oštećenja su vrlo raznolike i uključuju točkaste mutacije, translokacije, dobitak i gubitak kromosoma te skraćivanje telomera. Popravak DNA osiguran je različitim mehanizmima koji zajedno se mogu nositi sa većinom oštećenja DNA (71). Poremećaji mehanizama popravka DNA mogu uzrokovati ubrzano starenje kod miševa i temelj su nekoliko ljudskih sindroma ubrzanog starenja (progerija) (70). Oštećenja DNA mogu utjecati na esencijalne gene i transkripcijske

putove, što dovodi do pojave disfunkcionalnih stanica koje, ako se ne uklone apoptozom ili senescencijom, mogu ugroziti homeostazu tkiva i organizma u cijelini.

Uz neposredna oštećenja DNA, nepravilnosti u arhitekturi stanične jezgre, laminopatije, također mogu uzrokovati pojavu genomske nestabilnosti te prerano starenje (69).

Mutacije i delecije mitohondrijske DNA (mtDNA) također mogu pridonijeti starenju. mtDNA smatrala se glavnom metom somatskih mutacija zbog oksidacijskog mikrokoliša mitohondrija, nedostatka histona mtDNA te ograničenih mehanizama popravka oštećenja u usporedbi s nuklearnom DNA (72). Međutim, današnja istraživanja pokazuju da većina oštećenja mtDNA su posljedica pogrešaka pri replikaciji, a ne oštećenja inducirana oksidacijskim stresom (73). Prvi dokaz da bi oštećenja mtDNA mogla biti implicirana u proces starenja je otkriće višesistemskog humanog poremećaja koji se javlja zbog oštećenja mtDNA, a fenotipske promjene djelomično odgovaraju fenotipskim promjenama karakterističnim starenju.

UV zračenje također može uzrokovati oštećenje mtDNA (18). Najčešće uočeno oštećenje je delecija jednog para baza (4977), a nalazi se i do 10 puta češće u fotooštećenoj koži nego u koži zaštićenoj od sunca (74). Ta delecija uočena je u fibroblastima koji su *in vitro* izlagani subletalnim dozama UV zračenja (75). Također, ta delecija javlja se i u fibroblastima uzetim iz kože zaštićene od sunca, a nakon izlaganja fiziološkim dozama UVA kroz period od dva tjedna (74). Te mutacije perzistiraju i čak se povećavaju nakon prestanka izlaganja UV zračenju što podupire hipotezu da inicijalne mutacije na mtDNA potaknute UV zračenjem čine mitohondrije vulnerabilnijim za kasnija oštećenja ROS-om (18).

#### 4.3.2 SKRAĆIVANJE TELOMERA

Pri normalnom starenju dolazi do skraćivanja telomera. Telomere su specijalne strukture na krajevima linearnih kromosoma te u čovjeka telomere sadrže tisuće ponavljanja TTAGGG. Telomere se cirkulariziraju i tako štite kraj kromosoma te su stoga vrlo važne za stabilnost genoma. Progresivno se skraćuju tijekom svake diobe, a kad postignu kritičnu duljinu aktivira se proces programirane stanične smrti (apoptoza). Telomeraza je ribonukleoprotein odgovoran za održavanje duljine telomera. To je reverzna-transkriptaza koja replicira telomere koristeći unutarnji RNA kalup. Nedostatak telomerase kod ljudi povezan je s razvojem bolesti za koje je karakterističan gubitak regenerativnog potencijala tkiva kao što su pulmonarna fibroza, kongenitalna diskeratoza te aplastična anemija. I izloženost UV zračenju može pridonijeti skraćivanju telomera (18).

#### 4.3.3 EPIGENETSKE PROMJENE

Starenje je popraćeno različitim epigenetskim promjenama (76). One uključuju promjene uzorka metilacije DNA, postranslacijske promjene histona i remodeliranje kromatina. Različiti enzimatski sustavi su uključeni u održavanje epigenetskog uzorka, kao što su DNA metiltransferaze, histon acetilaze, deacetilaze, metilaze i demetilaze te proteinski kompleksi odgovorni za remodeliranje kromatina. Posebice su zanimljivi proteini sirtuini, NAD-ovisne protein deacetilaze i ADP ribosiltransferaze koje su u žarištu istraživanja kao potencijalni čimbenici koji usporavaju starenje. Za razliku od mutacija DNA, epigenetske promjene su barem teoretski reverzibilne te stoga se otvaraju nove mogućnosti u prevenciji i ublažavanju promjena koje se javljaju starenjem (77).

#### 4.3.4 GUBITAK PROTEOSTAZE

Starenje je povezano s poremećajem homeostaze proteina ili proteostaze (78). Proteostaza uključuje mehanizme stabilizacije pravilno nabranih proteina i mehanizme razgradnje proteina u proteosomu ili u lizosomu. Na taj način ili se uspostavlja pravilna struktura nepravilno nabranih polipeptida ili se oni razgrađuju te sprječava njihovo nakupljanje, a osigurava kontinuirano obnavljanje unutarstaničnih proteina. Određene patologije koje su povezane sa starenjem karakterizira nakupljanje nenabranih, nepravilno nabranih proteina ili njihovih nakupina.

#### 4.3.5 POREMEĆAJ FUNKCIJE MITOHONDRIJA

Starenjem dolazi do smanjenja učinkovitosti mitohondrijskog respiracijskog lanca, te tako do povećanja gubitka elektrona i smanjenja proizvodnje ATP-a (79). Iako se već dugo vremena raspravlja o vezi između mitohondrija i starenja, rasvijetljavanje molekulskih mehanizama predstavlja veliki izazov. Mitohondrijska teorija starenja predlaže da elektroni koji procure s lanca prijenosa elektrona (respiracijskog lanca) stvaraju ROS koji mogu oštetiti komponente samog lanca prijenosa elektrona te mitohondrijsku DNA, dovodeći do daljnjeg porasta razine ROS unutar stanice, smanjenja funkcije mitohondrija te globalnih staničnih oštećenja (80). Međutim, u posljednjih pet godina dolazi do ozbiljne reevaluacije mitohondrijske teorije starenja (81). Naime, najnoviji dokazi upućuju na to da ROS nemaju isključivo štetnu ulogu u starenju. Smatra se da je primarni učinak ROS-a aktivacija kompenzacijskih homeostatskih odgovora. Povećanjem kronološke dobi dolazi do staničnih oštećenja, ali i paralelnog povećanja ROS-a s ciljem održavanja homeostaze. Međutim, kad razina ROS-a prijeđe određeni prag, tad ROS gubi svoju homeostatsku ulogu te uzrokuje daljnja stanična

oštećenja (81). Ovaj novi konceptijski okvir može pomiriti naizgled proturječne dokaze o pozitivnim, negativnim ili neutralnim učincima ROS-a tijekom starenja.

Nefunkcionalni mitohondriji mogu pridonijeti starenju drugim mehanizmima neovisno o ROS-u (69), kao što su povećanje permeabilnosti mitohondrija pri stresu što utječe na signalizaciju u procesu apoptoze, poremećaj komunikacije između organela te aktivacija inflammasoma.

Smanjena učinkovitost mitohondrija koja se javlja starenjem također može biti posljedica različitih mehanizama uključujući smanjenu biogenezu mitohondrija. Smanjena biogeneza mitohondrija može biti posljedica skraćivanja telomera (82). Sirtuini imaju značajan utjecaj na biogenezu mitohondrija te uklanjanje nefunkcionalnih mitohondrija procesom autofagije. Time se potvrđuje ideju da telomere i sirtuini kontroliraju funkciju mitohondrija i tako imaju zaštitnu ulogu protiv bolesti povezanih sa starenjem.

Ostali mehanizmi koji uzrokuju poremećaje bioenergetike mitohondrija uključuju nakupljanje mutacija i delecija mtDNA, oksidaciju mitohondrijskih proteina, destabilizaciju makromolekulske organizacije superkompleksa respiracijskog lanca, promjene lipidnog sastava mitohondrijskih membrana, poremećaj dinamike mitohondrija kao posljedice neravnoteže između fizije i fuzije mitohondrija, poremećaji kontrole mitofagije, oblik makroautofagije specifičan za mitohondrije kojim se uklanjaju nefunkcionalni mitohondriji (83).

Poremećaj funkcije mitohondrija koji se javlja starenjem je također povezan s hormezom, konceptom prema kojem su se usmjerile različite linije istraživanja starenja (84). Prema tom konceptu, blagi toksični učinak potiče djelotvorne kompenzacijske odgovore koji nadilaze popravak nastalih oštećenja i zapravo dovode do poboljšanja stanja stanice u usporedbi s stanjem prije samog toksičnog učinka (85). Istraživanja pokazuju da metformin i resveratrol u



biti imaju blagi toksični učinak na mitohondrije što u konačnici ima pozitivan učinak na stanicu (86).

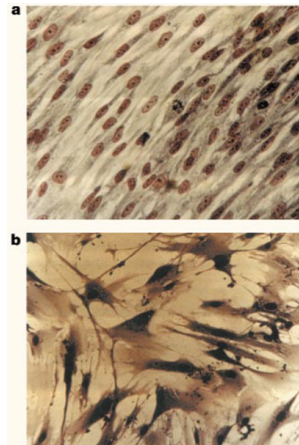
Funkcija mitohondrija ima značajan utjecaj na proces starenja. Mitohondrijska disfunkcija može ubrzati starenje u sisavaca, ali nije u potpunosti jasno može li poboljšanje mitohondrijske funkcije, primjerice kroz mitohormezu, produljiti životni vijek kod sisavaca, iako dokazi u tom smislu već postoje (69).

#### 4.3.6 STANIČNA SENESCENCIJA

Stanična senescencija može se definirati kao zaustavljenje stanica u staničnom ciklusu povezano sa stereotipnim fenotipskim promjenama (87). Ovaj fenomen je prvi opisao Hayflick (88). Budući da se broj senescentnih stanica povećava starenjem, smatra se da senescencija pridonosi starenju (slika 14). Međutim, nova razmišljanja upućuju da je primarna uloga senescencije spriječiti propagaciju oštećenih stanica te potaknuti njihovo uništenje putem imunskog sustava. Stoga, postoji mogućnost da je senescencija kompenzacijski obrambeni mehanizam kojim se organizam štiti od oštećenih i potencijalno onkogenih stanica. Međutim, to zahtjeva učinkoviti sustav kojim se uklanjaju senescentne stanice i mobiliziraju progenitorske stanice. Starenjem, taj sustav postaje neučinkovit ili se smanjuje regeneracijski kapacitet progenitorskih stanica, zbog čega dolazi do nakupljanja senescentnih stanica što dodatno pogoršava stanje te pridonosi starenju.

Posljednjih godina utvrđeno je da dolazi do promjena u sekretoru senescentnih stanica, koji postaje obogaćen proinflamacijskim citokinima i matriksnim metaloproteazama (87). Taj proinflamacijski sektorom može značajno pridonijeti starenju.

Prema najnovijim istraživanjima stanična senescencija smatra se djelotvornim kompenzacijskim mehanizmom na toksično djelovanje, ali postaje štetna kad tkiva iscrpe svoj regeneracijski kapacitet.



**Slika 14.** Stari i mladi fibroblasti u kulturi (preuzeto iz (89)). A) Mlade stanice nakon 20 dioba. B) Stare stanice nakon 55 dioba.

#### 4.3.7 NEDOSTATAK MATIČNIH STANICA

Glavna karakteristika starenja je gubitak regeneracijskog kapaciteta tkiva. Iscrpljenje matičnih stanica pokazalo se kao posljedica različitih vrsta staničnih oštećenja koja se javljaju starenjem i vjerovatno je jedan od glavnih krivaca za starenje tkiva i organizma u cijelini. Nedavna istraživanja pokazuju da obnavljanje matičnih stanica može obrnuti fenotip starenja na razini cijelog organizma (77). Farmakološke intervencije također se istražuju kako bi se poboljšala funkcija matičnih stanica. Primjerice rapamicin se pokazao učinkovitim u poboljšanju funkcije matičnih stanica u epidermisu (90).

#### 4.3.8 POREMEĆAJ MEĐUSTANIČNE KOMUNIKACIJE

Uz promjene na razini stanica, starenjem se javljaju i poremećaji u komunikaciji među stanicama bilo na endokrinoj, neuroendokrinoj ili neuronalnoj razini. Primjerice, s porastom upalnih reakcija, slabljenjem imunskog sustava te promjenama u peri- i izvanstaničnom okolišu stanica koje se javljaju starenjem dolazi do disregulacije neurohormonalne signalizacije (e.g. renin-angiotenzin, adrenergički, inzulin- čimbenik rasta sličan inzulinu 1 (engl. *Insulin-like growth factor 1*, IGF1) sustav).

Istaknuti sa starenjem povezani poremećaj u međustaničnoj komunikaciji je “upalno starenje”, proupalni fenotip koji se javlja starenjem. Različiti su uzroci proupalnog stanja uključujući oštećenja tkiva koja dovode do upale, slabljenje imunskog sustava zbog čega se smanjuje učinkovitost organizma u obrani od patogena i nefunkcionalnih stanica, pojačano lučenje proupalnih čimbenika od strane senescentnih stanica, pojačana aktivacija NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora te poremećaji u procesu autofagije (91). Među glavnim promjenama na razini genske ekspresije koje se javljaju starenjem je aktivacija NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora. Ispitivanja u eksperimentalnim životinjama pokazuju da inhibicijom pretjerane aktivacije NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora u ostarjeloj koži može doći do uspostave transkripcijskog programa karakterističnog za mladu kožu (92). Također, pokazano je da genetskom ili farmakološkom inhibicijom NF- $\kappa$ B signalizacijskog puta mogu se prevenirati promjene koje se javljaju starenjem u različitim animalnim modelima starenja (69).

Sirtuini također imaju utjecaj na staničnu signalizaciju povezanu s upalom te njihovom aktivacijom može se umanjiti pojava upalnih reakcija povezana sa starenjem u eksperimentalnih životinja (69).

Osim upale, opaženi su i drugi mehanizmi, kojim promjene povezane sa starenjem koje se javljaju u jednom tkivu mogu utjecati na starenje ostalih tkiva (kontinuirano starenje).

Primjerice, senescentne stanice uz lučenje upalnih čimbenika mogu utjecati na okolne stanice međustaničnom komunikacijom pukotinastim vezama (gap junctions) i procesima koji uključuju ROS (93). Postoje dokazi da eksperimentalnim usporavanjem starenja u jednom tkivu može se pozitivno djelovati i na ostala tkiva (69).

Istražuju se različite mogućnosti za ponovnu uspostavu međustanične komunikacije poremećenu starenjem, a s ciljem prevencije promjena povezanih s starenjem (69).

#### 4.3.9 OKSIDACIJSKI STRES I STARENJE

Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u prooksidacijskom-antioksidacijskom sustavu organizma u korist oksidacijskog stanja, što dovodi do potencijalnog oštećenja tkiva i organa (94).

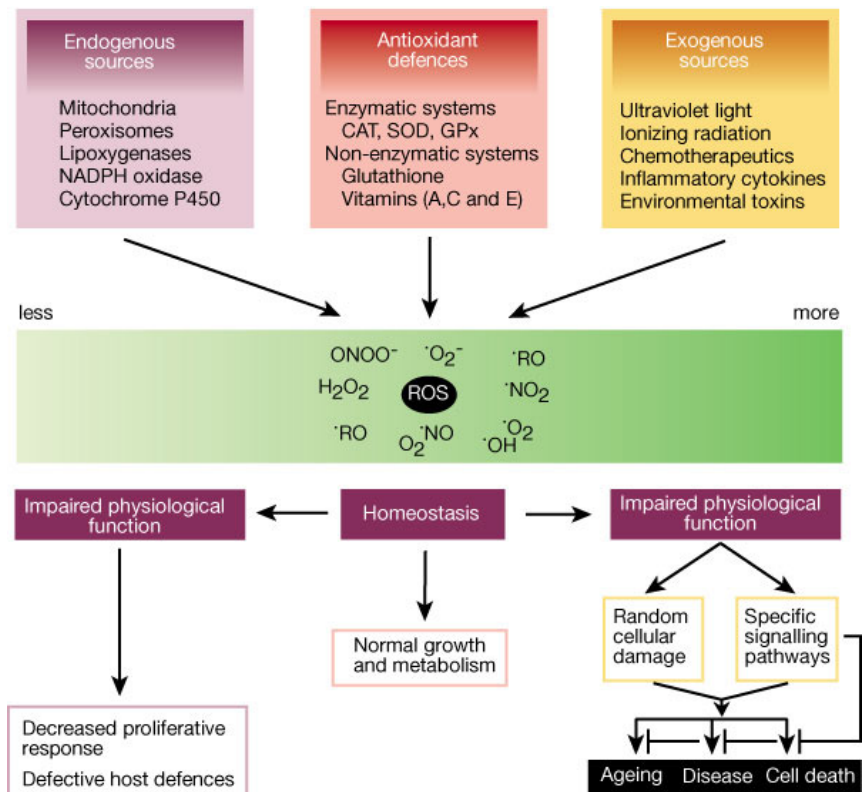
Slobodni radikali su molekule ili atomi koji u vanjskoj orbitali imaju jedan ili više nesparenih elektrona posljedica čega je njihova nestabilnost te visoka reaktivnost. ROS je zajednički naziv za skupinu vrlo reaktivnih spojeva u koju spadaju kisikovi radikali superoksid anion ( $O_2^-$ ) i hidroksilni radikal ( $OH^\cdot$ ), te drugi reaktivni spojevi kisika kao što su vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), reaktivni singlet kisik ( $^1O_2$ ), hipoklorna kiselina ( $HOCl$ ) te ozon ( $O_3$ ) koji također mogu uzrokovati oksidacijsko oštećenje bioloških molekula.

ROS se stvara u organizmu tijekom fizioloških i patoloških procesa, dok egzogeni su radikali dio toksičnih tvari koje unosimo u organizam (dim cigarete, ksenobiotici, alkohol) ili koje nastaju pod djelovanjem zračenja, zagađenja zraka i drugog (94). ROS-ovi se razlikuju po svojoj reaktivnosti te po oštećenjima koje uzrokuju.

Razinu oksidacijskog oštećenja stanice određuje sposobnost popravka oštećenja, odnosno ravnoteža između štetnih čimbenika i mogućnosti obrane stanice (94). Ukoliko stanje oksidacijskog stresa postoje predugo, ne samo da će ključne biomolekule pretrpjeti štetu,

već stanica može pokrenuti postupak poznat kao apoptoza ili programirana stanična smrt (95). Oksidacijski stres ubrzava starenje kultiviranih fibroblasta (96). Iako su stanični i mitohondrijski mehanizmi obrane (u koje spadaju antioksidacijski enzimi glutation-peroksidaza, glutation-reduktaza i superoksid-dismutaza) evoluirali pa se mogu suprotstaviti ROS-u, oni nisu savršeni pa se tijekom života akumuliraju oksidacijska oštećenja molekula. Oštećenje stanica povezano sa starenjem uključuje oksidaciju DNA što za posljedicu ima mutacije, oksidaciju proteina što za posljedicu ima njihovu smanjenu funkciju te oksidaciju lipida u membrani što za posljedicu ima smanjenu transportnu učinkovitost i vjerojatno izmjenu u transmembranskoj signalizaciji. Posljedica akumuliranih oštećenja je da ostarjela stanica ima smanjenu i sposobnost antioksidacije čime se dalje povećavaju oštećenja putem ROS-a i fenotip pogoršava (97).

Pod utjecajem UV zračenja također nastaju slobodni radikali koji mogu pokrenuti signalizacijsku kaskadu što u konačnici dovodi do povećane genske ekspresije MMP (18, 98). UV zračenje može povećati sintezu MMPs i do pet puta (99). UV zračenje preko ROS kao posrednika također inhibira gensku ekspresiju prokolagena tako što blokira signaliziranje TGF- $\beta$  receptora tipa II/Smad-a (100). ROS induciran UV zračenjem može inaktivirati TIMPs te tako neposredno djelovati na povećanje aktivnosti MMPs (99).



**Slika 15.** Izvori ROS-a i stanični odgovor (preuzeto iz (94)).

#### 4.4 KOZMECEUTICI KOJI POTIČU BIOSINTEZU KOLAGENA

Otkriće da fibroblasti fotootštećene i kronološki ostarjele kože imaju značajan kapacitet proizvodnje novog kolagena kada ih se ukloni iz njihovog fragmentiranog izvanstaničnog matriksa predstavlja osnovu za razvoj novih dermatokozmetičkih pristupa u prevenciji i usporavanju degenerativnih procesa starenja. Iako postoji mnoštvo kozmeceutika (biološki aktivnih tvari) za koje se tvrdi da poboljšavaju izgled i funkciju ostarjele i/ili fotootštećene kože, samo je mali broj njih primjereno ispitan te određen mehanizam njihovog djelovanja.

##### 4.4.1 RETINOIDI

Retinoidi su derivati vitamina A koji se dugi niz godina primjenju u terapiji psorijaze, akni i starenja kože (43). Retinoidi su zasad najučinkovitiji u sprječavanju degenerativnih promjena kože koje se javljaju starenjem. Učinkoviti su kod prirodnog starenja i fotostarenja. Pripravci s retinoičnom kiselinom su bili prvi topikalni pripravci za koje je dokazano da popravljaju izgled fotootštećene kože. Provedena su mnoga istraživanja koja upućuju na njihov pozitivan učinak u epidermisu i dermisu kože. U epidermisu potiču proliferaciju i diferencijaciju keratinocita što za učinak ima smanjenje naboranosti kože te sprječavanje nastanka novih bora (101, 102). Učinak u dermisu temelji se na inhibiciji ekspresije MMP (103) te stimulaciji proizvodnje kolagena (104). Također pokazali su se učinkoviti i u stanjima hiperpigmentacije kože (105, 106). Pri topikalnoj primjeni retinoida mogu se javiti ozbiljne nuspojave koje uključuju iritaciju kože. Drugi ograničavajući čimbenik njihove uspješne primjene je nestabilnost u pripravcima za topikalnu primjenu. Stoga su istraživanja usmjerena na razvoj derivata boljih svojstava (107, 108) te inovativnih formulacija (109, 110).

## MOLEKULSKI MEHANIZAM DJELOVANJA RETIONIDA

Vitamin A (sve-trans-retinol, ROL) i drugi prirodni retinoidi imaju važnu ulogu u regulaciji embriogeneze, vida, imunosti te diferencijaciji epitelnih stanica. Retionidi se u organizam unose putem prehrane, apsorbiraju iz probavnog sustava, skladište u jetri u obliku retinil-estera (RE), a prenose se krvlju do ciljnih tkiva u obliku sve-trans-retinola. Mobilizacija ROL iz jetre ovisi o plazmatskoj koncentraciji slobodnog proteina koji veže retinol (engl. *retinol binding protein*, RBP). RBP prenosi ROL do ciljnih tkiva i stanica. U ciljnim stanicama ROL se skladišti u staničnoj membrani u obliku RE ili prelazi u sve-trans-retinoičnu kiselinu (RA) koji je biološki aktivna. Prijelaz ROL u RA odvija se u dva koraka, prvi je prijelaz ROL u retinalaldehid (retinal) što je ograničavajući korak kataliziran enzimom alkohol-dehidrogenazom. Drugi korak je kataliziran enzimom retinalaldehid-dehidrogenazom i taj korak je ireverzibilan. U stanici ne dolazi do skladištenja RA već je koncentracija RA strogo kontrolirana.

U citoplazmi RA je vezana za stanični protein koji veže RA (engl. *cellular RA binding protein*, CRABP) te može biti transportirana u staničnu jezgru ili katabolizirana u neaktivne metabolite posredovanjem enzima RA-4-hidroksilaze. Koncentracija RA u koži je strogo regulirana: topikalnom primjenom RA inducira se RA-4-hidroksilaza, a smanjuje se biosinteza RA povećanom esterifikacijom ROL.

RA iskazuje svoj biološki učinak vezanjem na nuklearne receptore (engl. *retinoic acid receptor*, RAR) koji reguliraju ekspresiju gena. RAR ulaze u interakciju s retinoid X receptorima (RXR) te nastaje funkcionalan transkripcijski faktor. Postoje različite izoforme tih receptora, a u ljudskoj koži dominiraju RAR- $\gamma$  i RXR- $\alpha$ . RA ima tri stereoizomerne konfiguracije: sve-trans, 9-cis i 13-cis. RAR receptori vežu sve-trans i 9-cis, RXR vežu samo 9-cis, dok 13-cis se ne veže ni za RAR ni RXR. Vezanjem liganda za RAR, nastaju heterodimeri



RAR/RXR koji predstavljaju višejedinične proteinske komplekse koji reguliraju ekspresiju ciljnih gena koji u promotroskoj regiji sadrže elemente koji odgovaraju na RA (engl. RA response elements, RARE) na koje se vežu ti proteinski kompleksi.

## MEHANIZAM DJELOVANJA U KOŽI

Iako su molekularni mehanizmi djelovanja retinoida u koži složeni i nisu u potpunosti razjašnjeni, RA ili njezini metabolički prekursori retinol ili retinal potiču proizvodnju kolagena u fotooštećenoj i u kronološki ostarjeloj koži (111-113). Nakupljanje novog kolagena za rezultat ima popravljen izgled ostarjele kože. Veliki broj kontroliranih kliničkih ispitivanja pokazao je da topikalna primjena 0,025% - 0,1% RA (sve-trans-RA) popravlja izgled fotoostarjele kože (43). RA potiče ekspresiju gena prokolagena tipa I i III u fotooštećenoj ljudskoj koži (111), ali utječe i na akutne reakcije kože na UV zračenje koje potiču razgradnju kolagena (68). Pri topikalnoj primjeni na kožu ljudi ili miševa prije izlaganja UV zračenju, RA inhibira indukciju transkripcijskog faktora c-Jun i to na razini akumulacije proteina. c-Jun je potreban za nastanak aktivnog AP-1 kompleksa koji, stimulira transkripciju MMP-1, MMP-3 i MMP-9 i inhibira ekspresiju prokolagena tipa I i III.

Keratinociti i fibroblasti u koži, kao i većina drugih stanica imaju sposobnost pretvaranja vitamina A (ROL) iz cirkulacije u RA. Međutim, razine stanične RA su ograničene kataboličkom deaktivacijom. Ljudski keratinociti imaju sposobnost i da pretvaraju ROL u REL koji se onda skladište u staničnoj membrani, dok fibroblasti imaju malo ili nimalo kapaciteta da pretvore ROL u estere i zato ovise o dostavi ROL iz cirkulacije u biosintetizi RA. U keratinocitima brzina i kapacitet esterifikacije ROL su višestruko veće nego oksidacije u RA (114). Prema tome, esterifikacija sprječava oksidaciju ROL u RA. Smanjena sposobnost esterifikacije u fibroblastima bi trebala služiti za postizanje više razine RA u fibroblastima

nego u keratinocitima. Kako ljudska koža ima kapacitet da metabolički pretvara topikalno primjenjen ROL u RA, koncentracija ROL od otprilike 0,25% - 0,5% bi trebala imati terapijski i preventivni učinak ekvivalentan RA. Usporedbe sličnih biološki aktivnih koncentracija ROL i RA pokazuju manje izražen eritem i ljuštenje kože u slučaju topikalne primjene ROL. Kako ozbiljnost nuspojava kod RA ovisi o koncentraciji, stroga kontrola prijelaza ROL u RA, kako je ranije opisano, vjerojatno je uzrok tim zamiješćenim razlikama (6). Topikalno primijenjen vitamin A (retinol) može stimulirati proizvodnju kolagena i u zaštićenoj ostarjeloj koži (67). Rezultati su pokazali da je topikalna primjena 1% vitamina A tijekom 7 dana potaknula proliferaciju fibroblasta i sintezu kolagena i istovremeno smanjila razinu MMP-a. Time je potvrđen potencijal topikalne primjene retinoida u sprječavanju degenerativnih procesa vezivnog tkiva prirodno ostarjele kože kao kao i u fotooštećene kože.

Učinkovitost retinoida u sprječavanju degenerativnih promjena kože ispitivana je i dokumentirana, histološki i klinički, bolje nego bilo koji aktivna tvar u dermatologiji. Topikalna primjena retinoida, a naročito retinola smatra se zlatnim standardom sa kojim se uspoređuju sve aktivne tvari pri ispitivanju potencijala za ublažavanje i prevenciju degenerativnih promjena kože izazvanih kronološkim ili fotostarenjem (115) (116).

#### RETINOIDI U DERMATOKOZMETIČKIM PRIPRAVCIMA

Prvu generaciju retinoida čine retinol, retinaldehid, tretinoin, isotretinoin i alitretinoin; drugu generaciju čine etretinat i acitretin; treću generaciju adapalen i tazaroten; četvrtu generaciju čini seletinoid G.

Tretinoin (vitamin A u obliku karboksilne kiseline, retinoična kiselina) je najviše istraživan retinoid vezano za intrinzično starenje ili fotostarenje. Nakon kratkotrajnih studija koje su pokazale značajno kliničko poboljšanje, rađene su dugotrajne studije od 6 i više mjeseci s

različitim koncentracijama tretinoina da bi se došlo do optimalne koncentracije za ublažavanje promjena nastalih fotostarenjem i utvrdile koristi i rizici pri dugotrajnoj primjeni tretinoina.

Svakodnevnom primjenom 0,05% tretinoin kreme više od 6 mjeseci značajno su umanjeni klinički znaci starenja (117), s izraženim poboljšanjem stanja kože na dermalnoj razini gdje je uočeno stvaranje novih vlakana kolagena kao i smanjenje količine degeneriranog mikrofibrilarnog materijala (118). Kontinuirana primjena jednom dnevno je obavezna za postizanje maksimalnih rezultata, a koji se javljaju tek nakon perioda od 3 mjeseca. Radi očuvanja rezultata, neophodna je dugotrajno primjena. Ne postoje ograničenja trajanja lokalne primjene tretinoina.

Primjena 0,05% kreme tretinoina tri puta tjedno učinkovitija je u poboljšanju stanja finih bora nego primjena jednom tjedno, dok prekid primjene donekle poništava postignuti učinak (119).

Najčešće se primjenjuje u koncentraciji od 0,025, 0,05 i 0,1%, ali je incidencija nuspojava značajno veća pri primjeni 0,1%-tne kreme (120). Tretinoin krema (0,02%) odobrena je za ublažavanje degenerativnih promjena koje se javljaju fotostarenjem od strane Američke agencije za hranu i lijekove (*engl.* Food and Drug Administration, FDA).

Da bi se izbjegle nuspojave povezane sa topikalnom primjenom retinoida te ubrzala pojava blagotvornih učinaka tretinoina (121), ispitan je učinak primjene visoke doze tretinoina (0,25 %) u podlozi koja brzo prodire u kožu. Nakon 4-6 tjedana uočeno je poboljšanje stanja finih bora, hiperpigmentacije, elastičnosti, hidratacije, angiogeneze i nove naslage kolagena iznad zone solarne elastoze, a veličina promjena je slična rezultatima koji su primjećivani nakon 6 do 12 mjeseci pri primjeni 0,05%-tnog tretinoina u klasičnoj podlozi. Nuspojave su brzo nestajale, a pacijenti dobro podnosili terapiju.

Provedena je klinička studija topikalne primjene tretinoina s ciljem ispitivanja učinka pri kronološkog starenju kože. U ispitivanju je korištena 0,025%-tna kremom tretinoina jednom dnevno tijekom 9 mjeseci (122). Krema je nanošena na unutrašnju stranu bedra kod 6 žena (srednja vrijednost godina 74). Klinički poboljšanje bilo je skromno (koža manje suha, s manje bora, malo čvršća i sa ružičastim tonom), ali su histološke promjene u usporedbi sa podlogom bile značajnije (povećana sinteza elastina i GAGs).

Tretinoin je na tržištu dostupan u obliku kreme (0,025, 0,05 ili 0,1%), gela (0,01 i 0,025%) i otopine (0,05 %). Krema su općenito preporuča za suhu i osjetljivu kožu (123).

Umjerena neželjena djelovanja na koži, posebice eritemi i deskvamacija, smanjuju se nakon 2 do 4 tjedna nakon početka primjene. U nekim slučajevima je neophodno prekinuti primjenu na 2 do 3 dana, kada treba primenjivati umirujuću i hidratantnu kremu, a zatim se primjena nastavlja jednom dnevno, svaki drugi dan. Uz tretinoin je preporučena uporaba kreme sa zaštitnim faktorom (124).

#### RETINOL (VITAMIN A, ALL-TRANS RETINOL), RETINALDEHID I DERIVATI RETINOLA

Topikalna primjena 1%-tnog retinola tijekom 7 dana smanjuje ekspresiju MMP-a, kolagenaza i želatinaza sa istovremenim povećanjem proliferacije fibroblasta i sinteze kolagena u ispitivanim uzorcima tkiva zbog čega bi trebao biti učinkovit u ublažavanju degenerativnih promjena dermisa pri kronološkom starenju i fotostarenju. Međutim, podloga igra ključnu ulogu jer je retinol izuzetno nestabilan te se lako pretvara u biološki neaktivne oblike kad je izložen svjetlu i zraku (67). Učinkovitost retinola je 20 puta slabija nego tretinoina, a za učinak neophodna je pretvorba u retinoičnu kiselinu (125).

Kod fotostarenja se koristi u obliku kreme u različitim koncentracijama, u rasponu od 0,075% do 1%. Često se koristi kao alternativa za tretinoin kod osjetljive kože (125).

Derivati retinoida unaprijeđenih svojstava razvijeni su s ciljem poboljšanja kemijske stabilnosti retinola. Retinil acetat, retinil propionat i retinil palmitat su u širokoj uporabi u kozmetičkim proizvodima. Zanimljiv derivat je N-formilaspartam koji ima vrlo izraženu fotostabilnost (126).

Retinaldehid je međuprodukt (intermedijalni metabolit) koji nastaje pri transformaciji retinola u retinoičnu kiselinu. Formuliran je u obliku kreme ili gela u koncentracijama koje variraju od 0,015% do 0,1%. Po učinkovitosti je sličan tretinoinu, s manje izraženim nuspojavama (iritacija kože) (127).

Tazaroten je acetilenski retinoid koji se koristi u topikalnom liječenju psorijaze i akni. Ima specifičan afinitet vezanja za  $\beta$  i  $\gamma$  receptore retinoida. 0,1%-tna krema tazarotena ima sličnu učinkovitost kao i 0,05%-tna krema tretinoina. Lokalne nuspojave su uglavnom blage ili umjerene, a njihov intenzitet se povećava (uglavnom peckanje) s većim koncentracijama tazarotena (128). Dostupan je u obliku 0,05 i 0,1 %-tnog gela i kreme.

Adapalen se obično upotrebljava u liječenje akni, ali je njegov učinak ispitan i u ublažavanju degenerativnih promjena vezanih za fotostarenje. Primjenom adapalena u obliku 0,1 ili 0,3%-tnog gela jednom dnevno, tijekom 4 tjedna, a zatim primjenom dva puta dnevno tijekom 9 mjeseci, dolazi do značajnog poboljšanja bora i drugih kliničkih obilježja fotoostarjele kože. Dobro se podnosi (129), pa se primjenjuje kao druga linija u borbi protiv fotostarenja, uglavnom kod nepodnošljivosti konvencionalnih retinoida.

Seletinoid G predstavlja četvrtu generaciju retinoida koji bi mogli naći važno mjesto u prevenciji i ublažavanju promjena vezanih za intrinzično odnosno fotostarenje. Topikalnom primjenom seletinoida G potiče se ekspresija prokolagena tipa I, tropoelastina i fibrilina-1 te

se smanjuje ekspresija MMP-1. Seletinoid G je jednako učinkovit kao i tretionin s dodatnom prednošću zbog odsutnosti iritacije kože (130).

Najčešći zajednički i često negativni učinak topičkih retinoida je "retinoidna reakcija", koju karakterizira svrbež, peckanje na mjestu primjene, eritem te ljuštenje kože. Uglavnom se javlja unutar prvih tjedana primjene. Druga nuspojava povezana s retinoidima je fotoosjetljivost, koja se obično javlja na početku terapije. Stoga se preporuča izbjegavanje prekomjernog izlaganja suncu te uporaba pripravaka za zaštitu od sunca. Nakon nekoliko mjeseci primjene, odgovor kože na UV zračenje se normalizira. Primjena retinoida u trudnoći se ne preporuča, jer sistemska izloženost retinoidima može uzrokovati pojavu teratogenosti/embriotoksičnosti. Za suzbijanje simptoma retinoidne reakcije, preporuča se smanjenje učestalosti primjene ili primjena retinoida s nižim iritacijskim potencijalom. Međutim, ako se iritacija kože javlja i pri primjeni najniže koncentracije retinoida, primjenu treba prekinuti.

#### 4.4.2 VITAMIN C (L-ASKORBINSKA KISELINA)

Vitamin C je L-enantiomer askorbinske kiseline te je biološki najaktivniji oblik. Djelovanje vitamina C na kožu je višestruko: podupire sintezu kolagena, djeluje kao antioksidans, posvjetljava hiperpigmentacije i djeluje protuupalno (131). Razine vitamina C koje se postižu u koži topikalnom primjenom su 20 do 40 puta veće od onih koje se postižu oralnom primjenom vitamina C.

Vitamin C djeluje kao kofaktor u biosintezi kolagena. Prvenstveno je neophodan za proces hidroksilacije, ostatka prolina i lizina enzimatskim djelovanjem prolil-hidroksilaze i lizil-hidroksilaze. Vitamin C je također potreban i za izlučivanje molekula prokolagena iz stanice. Bez dovoljne razine vitamina C narušava se formiranje kolagenskih vlakana.

Vitamin C je snažni antioksidans, a u redoks procesima oksidira u dehidro-L-askorbinsku kiselinu koja se može ponovo reducirati u L-askorbinsku kiselinu pomoću endogenih antioksidansa ili se raspasti u diketogulonsku kiselinu.

Izlaganjem kože UV zračenju, čak i u minimalnim dozama, dolazi do drastičnog pada razine vitamina C u koži. Topikalnom primjenom se može nadoknaditi, iako je problem u tome što je vitamin C izrazito nestabilan. Da bi bio biološki aktivan vitamin C mora ostati u slobodnoj formi i biti stabilan. Najveća učinkovitost vitamina C se postiže s koncentracijom od 20% i pri pH 3,5 (131).

Osim regenerativno, vitamin C djeluje i protektivno na razvoj fotooštećenja. Primijenjen nakon izlaganja suncu smanjuje eritem i sprečava razvoj opekline i do 50%. Također, topikalno primijenjen nakon tretmana laserom skraćuje vrijeme trajanja i stupanj eritema (131).

Problem topikalne primjene vitamina C je njegova kemijska nestabilnost. Čimbenici koji utječu na stabilnost, odnosno povećavaju brzinu razgradnje su: visoki pH, povišena temperatura, prisutnost otopljenog kisika i iona metala. Razgradnja, najčešće u pratnji žućkaste boje se može nastaviti ubrzano ovisno o tipu formulacije, pakiranju i uvjetima skladištenja (132). Stoga se posebna pažnja treba usmjeriti na formulaciju, ali i na ispravno pakiranje u zrakopraznoj i za svjetlo nepropusnoj ambalaži (133). Također, kako bi se riješio problem stabilnosti, sintetizirani su derivati sličnog djelovanja kao vitamin C, ali poboljšane stabilnosti. Primjerice askorбил-2-fosfati u obliku natrijeve ili magnezijeve soli, su stabilni u otopini pri pH 7. Od estera najčešće se koriste esteri askorbinske kiseline (primjerice askorбил-6-palmitat, askorбил-2-glukozid i tetra-izo-palmitoil askorbat). Ti derivati razlikuju se u sposobnosti penetracije kroz kožu, kao i u stabilnosti i učinkovitosti (134).

Topikalnom primjenom kreme sa 5%-nim vitaminom C tijekom 6 mjeseci dolazi do značajnog smanjenja bora. Vitamin C je uglavnom siguran za svakodnevnu topikalnu primjenu, rijetko se javlja peckanje i eritem.

#### 4.4.3 VITAMIN E

Vitamin E je liposolubilni vitamin prisutan u mnogim izvorima hrane, posebno u soji, orasima, cjelovitom brašnu i uljima (135). Prirodni vitamin E sastoji se od osam različitih derivata ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola i  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokotrienola). Općenito se pretpostavlja da je  $\alpha$ -tokoferol biološki najaktivniji. Zbog svojih jakih antioksidacijskih i lipofilnih svojstava, vitamin E igra ključnu ulogu u zaštiti staničnih membrana i lipida od oksidacijskih oštećenja. Brojne studije su dokazale ulogu topikalno primijenjenog vitamina E u smanjenju akutnog i kroničnog negativnog učinka UV-zračenja na kožu, poput eritema i edema, opekline, DNA fotooštećenja, imunosupresije i fotokarcinogeneze (136). Razina oksidiranih lipoproteina ili podložnost oksidaciji lipoproteina povećava se starenjem, i zbog toga se količina antioksidacijskih molekula koje se prirodno nalaze u koži ne može spriječiti stanja oksidacijskog stresa u starijih.

Iako vitamin E ne djeluje neposredno na sintezu kolagena, njegov posredni učinak moguć je kroz regulaciju stanja oksidacijskog stresa (137).

Za optimalnu prevenciju i ublažavanje promjena koje se javljaju starenjem potrebne su kombinacije aktivnih tvari s različitim mehanizmima djelovanja. Primjerice vitamini C i E imaju sinergistički učinak zbog sposobnosti vitamina C da regenerira vitamin E po njegovoj oksidaciji. Stoga se često formuliraju zajedno u kozmetičke pripravke.

U kozmetici se osim češće korištenih oblika vitamina E, tokoferol i tokoferil acetata, koriste i neki drugi esteri kao npr. sukcinat, nikotinat, linoleat i fosfat.



Incidencija kontaktnog dermatitisa može biti relativno velika kod određenih oblika tokoferola, a topikalna primjena vitamina E također je povezana s kontaktnom urtikarijom, ekscematoznim dermatitisom i eritemom.

#### 4.4.4 KOENZIM Q10 (UBIKVINON)

Koenzim Q (ubikvinon, CoQ10) je lipofilna molekula široko rasprostranjena u prirodi, a sastoji se od benzokinona i bočnog lanca izoprenoidih jedinica (138). CoQ10 sintetizira se u ljudskom organizmu te se nalazi većinom u membrani mitohondrija (139). Manji dio se dobiva putem hrane.

CoQ10 je ključna komponenta mitohondrijskog respiracijskog lanca. Starenjem kože se smanjuje energija staničnog metabolizma što je djelomično uzrokovano štetnim promjenama u mitohondrijskoj respiraciji. Narušavanje mitohondrijske funkcije onemogućava staničnu ATP sintezu. Starenjem također pada razina CoQ10, što ukazuje da je smanjenje sadržaja CoQ10 u mitohondrijima sastavni aspekt starenja kože (140). Topikalna primjena CoQ10 može poboljšati endogeni mitohondrijski energetska kapacitet. Dokazano je da topikalno primjenjen CoQ10 ima učinak na smanjenje UVA-inducirane ekspresije MMP te potiče sintezu elastina i kolagena (140-142). Uz topikalnu primjenu CoQ10 nisu prijavljene nuspojave (143).

#### 4.4.5 PEPTIDI ZA TOPIKALNU UPORABU

Koža proizvodi peptide specifične biološke aktivnosti kojima osigurava svoju funkciju u zdravlju i bolesti. Istraživanjem tih peptida otvaraju se nove mogućnosti kako u terapiji kožnih oboljenja tako i u prevenciji starenja kože (144). Peptidi koji se primjenjuju topikalno na kožu, a ciljem prevencije degenerativnih promjena starenja, mogu se podijeliti u četiri skupine: (i) signalni peptidi, (ii) peptidi koji inhibiraju enzime, (iii) peptidi koji inhibiraju neurotransmitore i (iv) peptidi nosači (145).

Signalni peptidi stimuliraju aktivnost fibroblasta dermisa te potiču proizvodnju proteina izvanstaničnog matriksa posebice kolagena (145). U tablici 2 navedeni su signalni peptidi koji se koriste u pripravcima za prevenciju starenja kože.

Signalni peptid koji se najviše ispitan u prevenciji starenja kože je lizin–treonin–treonin–lizin–serin (KTTKS), a sastojak je skupih kozmetičkih pripravaka. KTTKS je fragment C-propeptida kolagena tipa I, a otkrila ga je 1993. godine skupina istraživača sa Sveučilišta u Tennesseeju (146). Smatra se C- i N-propeptidi uklonjeni s molekule prokolagena sudjeluju u autoregulaciji sinteze kolagena (20). KTTKS predstavlja minimalnu sekvencu C-propeptida kolagena tipa I koja stimulira sintezu proteina izvanstaničnog matriksa (146). KTTKS specifično stimulira proizvodnju kolagena tipa I i III te fibronektina. Najčešće se koristi palmitoil-KTTKS. Učinkovit je u niskim koncentracijama, što ima i ekonomsku praktičnost, jer je palmitoil-KTTKS prilično skup. Preporučena koncentracija palmitoil-KTTKS-a u kozmetičke svrhe je između 2 i 8 ppm (2-8 mg kg<sup>-1</sup>). Dobro se podnosi, sa niskom incidencijom neželjenih iritacija kože kao što su crvenilo, suhoća, osjećaj pečenja ili bockanja.

Palmitoil-tripeptid-3/5 (Syn®-Coll, Pentapharm, Basel, Švicarska) oponaša djelovanje trombospondina I, proteina koji se veže na čimbenik rasta TGF- $\beta$  te ga inaktivira čime se potiče proizvodnja kolagena (145). Dokazana je njegova učinkovitost u smanjenju izraženosti bora te poboljšanju čvrstoće i tonusa kože.

Tripeptid-10 Citrulin (Decornyl™, Centerchem, Norwalk, Connecticut, SAD) oponaša peptidne sekvence dekorina, proteoglikana koji se veže za kolagenska vlakna i ima važnu ulogu u organizaciji izvanstaničnog matriksa. Decornyl™ potiče nastanak kolagenskih vlakana te utječe na njihovu debljinu i organizaciju u izvanstaničnom matriksu (145).

Proteini toplinskog šoka su uključeni u jedan od osnovnih mehanizama obrane stanica od stresa. Iz te obitelji, istražuje se učinak Hsp70 (engl. *Heat shock protein 70*) u zacijeljivanju rana te prevenciji ili ublažavanju degenerativnih promjena koje se javljaju starenjem (147). Posebice se istražuje njegov učinak u prevenciji fotostarenja. Mehanizam djelovanja Hsp70 temelji se na sprječavanju agregacije denaturiranih proteina te pravilnom nabiranju proteina. Koristeći *in vitro* i *ex vivo* modele kože pokazano je da Hsp70 sprječava morfološke promjene uzrokovane UV zračenjem.

Tablica 2. Signalni peptidi u prevenciji degenerativnih promjena dermisa

Peptid	Generički naziv	Podrijetlo	Mehanizam djelovanja
Acetil-tetrapeptid-9	Ac-TP1	Sintetski peptid	Potiče proizvodnju kolagena tipa I i lumikana
Biopeptid-CL	Pal-GHK	Sintetski peptid	Potiče proizvodnju kolagena i glikozaminoglikana
Tripeptid-10 Citrulin	Decornyl™	Sintetski peptid	Regulira fibrilogenezu kolagena te utječe na debljinu i raspored vlakana
Hormon rasta	hGH	Rekombinantni peptid	Potiče sintezu IGF-1, aktivnost keratinocita i fibroblasta
Pal-KTTKS	Palmitoil pentapeptid-4, palmitoil pentapeptid-3, palmitoil oligopeptid, Matrixyl®	Sintetski peptid	Potiče proizvodnju kolagena tipa I i III, fibronektina, elastina i glukozaminoglikana
Protein toplinskog šoka 70	Hsp70	Rekombinantni peptid	Štiti stanice od UV zračenja
Peptamid-6	FVAPFP (phe-val-ala-pro-phe-pro)	Rekombinantni peptid	Potiče sintezu kolagena i ostalih proteina izvanstaničnog matriksa te čimbenika rasta
Syn®-Coll	Palmitoil tripeptid-3/5	Sintetski peptid	Potiče proizvodnju kolagena i glikozaminoglikana
Transformirajući čimbenici rasta	TGF- $\alpha$ i TGF- $\beta$	Rekombinantni peptid	Potiče kemotaksiju fibroblasta

Značajniji predstavnik skupine peptida koji inhibiraju enzime su peptidi ili proteini soje koji inhibiraju proteaze. Često se koristi u pripravcima za prevenciju starenja kože. Inhibirajući proteaze potiče se sinteza kolagena i glikozaminoglikana.

Peptidi/amino kiseline riže (Colhibin®) su grupa prirodnih proteina koji inhibiraju aktivnost metaloproteaza izvanstaničnog matriksa i induciraju ekspresiju hijaluronan-sintaze 2 u keratinocitima (148).

U tu skupinu spadaju i proteini svile kojima se najčešće pripisuje i antioksidacijski učinak te visoki afinitet za bakar (145).

Peptidi koji inhibiraju neurotransmitore najčešće inhibiraju oslobađanje acetilkolina na živčano-mišićnim spojevima. Najpoznatiji su botulin toksini (tip A-G) koji selektivno

razgrađuju protein SNAP-25 (engl. *synaptosome-associated protein of 25000 Da*), sintaksin 1 i sinaptobrevin, proteine SNARE (engl. soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor) odgovorne za oslobađanje neurotransmitora te izazivaju neuromuskularnu paralizu različitog trajanja. Botulin toksin tip A uzrokuje paralizu u trajanju 4 do 6 mjeseci te je stoga dobar kandidat za sprječavanje nastanka bora.

Istražuju se također peptidi sličnog učinka, ali manje invazivnog načina primjene kao primjerice acetil-heksapeptid-3 (Argireline®) koji se može primijeniti topikalno na kožu u obliku kreme (149).

Pentapeptid-18 (Leuphasyl®) oponaša mehanizam djelovanja enkefalina te stoga inhibira oslobađanje kateholamina. Istraživan je učinak Leuphasyl® u kombinaciji s Argireline® što je dovelo do značajnog smanjenja bora u usporedbi s pojedinačnim peptidima (145).

Pentapeptid-3 (Vialox®) je kompeticijski antagonist acetilkolinskih receptora, blokira oslobađanje iona natrija na sinaptičkoj membrani mišića te stoga smanjuje učestalost mišićnih kontrakcija. *In vitro* ispitivanja pokazuju smanjenje mišićne kontrakcije za 71% u unutar 1 min i 58% 2 sata nakon primjene. Smanjenje učestalosti mišićnih kontrakcija rezultira manje izraženim borama. Nakon 28 dana primjene pripravka s pentapeptidom-3 dva puta dnevno, dubina bora smanjena je za otprilike 49% (145).

Tripeptid-3 (Syn®-Ake) oponaša učinak Waglerina-1, peptida iz otrova zmijske *Tropidolaemus wagleri*, nastanjene u jugoistočnoj Aziji. Smanjuje se učestanost mišićnih kontrakcija za oko 82% 2 sata nakon primjene (145).

Peptidi nosači olakšavaju transport važnih bioaktivnih tvari ili elemenata u tragovima (Cu ili Mn) koji su neophodni za aktivnost enzima.

Tripeptid 1 (glicin-histidin-lizin, GHK) je značajan predstavnik ove skupine. Koristi se kao nosač Cu (Cu-GSK). Izoliran je iz ljudske plazme te je uočen njegov potencijal u zacijeljivanju

rana odnosno u remodeliranju izvanstaničnog matriksa odnosno tkiva (150). Može se svrstati i u skupinu signalnih peptida koji potiču razgradnju nakupina kolagena u ožiljcima, ali i reguliraju sintezu kolagena u normalnoj koži, potiču sintezu elastina, proteoglikana i glikozaminoglikana, reguliraju aktivnost i migraciju stanica te ima protuupalni i antioksidacijski učinak (145, 150).

#### 4.4.6 ČIMBENICI RASTA KAO KOZMECEUTICI

Topikalna primjena ljudskih čimbenika rasta u više se kliničkih ispitivanja pokazala učinkovita u smanjenju degenerativnih promjena koje prate starenje, posebice u smanjenju naboranosti kože te povećanju sinteze dermalnog kolagena (47, 151-153). Zbog određene sličnosti biokemijskih procesa intrinzičkog i ekstrinzičkog starenja sa procesima cijeljenja rana te poznate uloge čimbenika rasta u procesu cijeljenja rana, javio se veliki interes za ispitivanje uloge čimbenika rasta u prevenciji starenja.

Proces cijeljenja rane sastoji od suptilno balansiranih različitih procesa (154). Svaka faza cijeljenja pokreće se i prekida stimulatorima i inhibitorima koji nastaju prirodnim putem u samom organizmu. Ti stimulatori i inhibitori poznati su kao čimbenici rasta, citokini i MMP. Pri cijeljenju rana i pri oštećenjima kože potaknutim UV zračenjem prva faza je faza upale koja se aktivira kroz nekoliko signalnih putova uključujući NF- $\kappa$ B posredovanu aktivaciju TNF- $\alpha$  i interleukina (155). Prijelaz iz upalne faze u fazu stvaranja granulacijskog tkiva pri cijeljenju rana posredovan je čimbenicima rasta i citokinima koje luče makrofazi, keratinociti te fibroblasti. Oštećeno tkivo u rani nadomijesti se granulacijskim tkivom koje je rezultat višestrukih procesa (umnožavanje fibroblasta, sinteza kolagena, angiogeneza). Nakon toga slijedi još zadnja faza cijeljenja rane, a to je faza remodelacije ili faza maturacije i epitelizacije (154). Tijekom te faze dolazi do zamjene neorganiziranih vlakana kolagena i struktura

elastina proizvedenih tijekom prethodne faze s jačim vlaknima kolagena i strukturiranim elastinskim vlaknima kako bi se osigurala čvrstoća i otpornost dermisa. Razumijevanje faze remodelacije ključno je u sprječavanju promjena koje se javljaju starenjem.

U tablici 3 navedeni su čimbenici rasta i citokini koji imaju utjecaj na proliferaciju fibroblasta i proizvodnju izvanstaničnog matriksa. Različiti dermatokozmetički pripravci koji sadrže određeni čimbenik rasta ili kombinaciju različitih čimbenika rasta i citokina namijenjenih pomlađivanju kože nalaze se trenutno na tržištu (47).

Tablica 3. Čimbenici rasta i citokini koji imaju utjecaj na proliferaciju fibroblasta i proizvodnju izvanstaničnog matriksa (preuzeto iz (47)).

Čimbenik rasta/citokin	Ciljne stanice i učinak
HB-EGF	Mitogen keratinocita i fibroblasta
FGF 1,2 i 4	Angiogeni mitogeni i mitogeni fibroblasta
PDGF	Djeluje kemotaktično za makrofage i fibroblaste; aktivacija makrofaga; mitogeni fibroblasta; potiče proizvodnju matriksa
IGF-1	Mitogen endotelne stanice i fibroblasta
TGF- $\beta$ 1 i $\beta$ 2	Migracija keratinocita; kemotaktični za makrofage i fibroblaste
TGF- $\beta$ 3	Sprječava nastanak ožiljaka
IL-1 $\alpha$ i - $\beta$ , TNF- $\alpha$	Rani aktivatori ekspresije faktora rasta u makrofazima, keratinocitima i fibroblastima

TNS Recovery Complex (SkinMedica Inc., Carlsbad, Kalifornija, SAD) je formulacija u obliku gela koja sadrži NouriCel-MD, patentiranu i zaštićenu kombinaciju čimbenika rasta, citokina i topljivih proteina matriksa koje izlučuju kultivirani neonatalni ljudski dermalni fibroblasti (47). Već su odobreni pripravci za liječenje opekline ili cijeljenje rana koji sadrže čimbenike rasta i citokine dobivene iz neonatalnih fibroblasta kao primjerice Dermagraft i TransCyte (Advanced BioHealing, La Jolla, Kalifornija, SAD).



**Slika 16.** Smanjenje periorbitalnih bora pri primjeni pripravka TNS Recovery Complex tijekom šest mjeseci (preuzeto iz (47)).

U kliničkom ispitivanju s ispitanicima skupine II ili više po Fitzpatrickovoj klasifikaciji fotootštećenja kože, pri primjeni TNS Recovery Complex dva puta dnevno tijekom 6 mjeseci došlo do vidljivog smanjenja periorbitalnih bora unutar 3 mjeseca, a napredak je nastavljen tijekom 6 mjeseci (slika 16). Također je došlo do značajnog porasta količine dermalnog kolagena (Grenz-zone).

Bio-Restorative Skin Cream (NeoCutis, Inc., San Francisco, Kalifornija, SAD) je formulacija u obliku kreme koja sadrži proteine stanica kože (engl. *Processed Skin-Cell Proteins*, PSP), zaštićenu smjesu čimbenika rasta i citokina ekstrahiranu iz kulture humanih fetalnih fibroblasta kože. U kliničkom ispitivanju s ispitanicima skupine II ili više po Fitzpatrickovoj klasifikaciji fotootštećenja kože, pri primjeni tog pripravka dva puta dnevno tijekom 60 dana uočeno je značajno smanjenje bora u periorbitalnom i perioralnom području. Uočeno je i poboljšanje teksture kože u području obraza i brade (153).

Još jedan zanimljiv pripravak je Cell Rejuvenation Serum (CRS, Topix Pharmaceuticals, New York, SAD) koji sadrži liposome s uklopljenim TGF- $\beta$ 1, L-askorbinsku kiselinu i ekstrakt biljke *Cimicifuga racemosa* u silikonskoj podlozi (47).



#### 4.4.7 MEHANIZAM DJELOVANJA TOPIKALNO PRIMJENJENIH ČIMBENIKA RASTA

Čimbenici rasta i citokini su hidrofilne molekule molekulske mase veće od 15 kDa i malo je vjerojatno da mogu permeirati kroz epidermis te dospjeti u dermis u količini dovoljnoj za njihov biološki učinak. Međutim, kliničkim ispitivanjima potvrđen pri topikalnoj primjeni na kožu je njihov učinak u ublažavanju promjena koje se javljaju starenjem. Smatra se da čimbenici rasta i citokini mogu iskazati svoj pozitivni učinak na dermis temeljem dvaju mehanizama (47). Prvi je njihova permeacija putem folikula dlake, znojnih žlijezda ili oštećene kože, a drugi se temelji na njihovoj interakciji sa keratinocitima u epidermisu koji zatim proizvode signalne citokine koji utječu na fibroblaste u dermisu (156). Keratinociti na svojoj površini eksprimiraju receptore za različite čimbenike rasta i citokine. Permeacija čimbenika rasta ili citokina u maloj koncentraciji u žive slojeve epidermis potiče keratinocyte na proizvodnju čimbenika rasta/citokina kao što su PDGF, IL-1, TGF- $\alpha$  i TGF- $\beta$  koji onda ispoljavaju parakrini učinak na dermalne fibroblaste. Time se potiče proliferacija i aktivacija fibroblasta što je temelj za regeneraciju i remodeliranje izvanstaničnog matriksa dermisa.

#### 4.4.8 LASERSKO POMLAĐIVANJE KOŽE UZ ČIMBENIKE RASTA

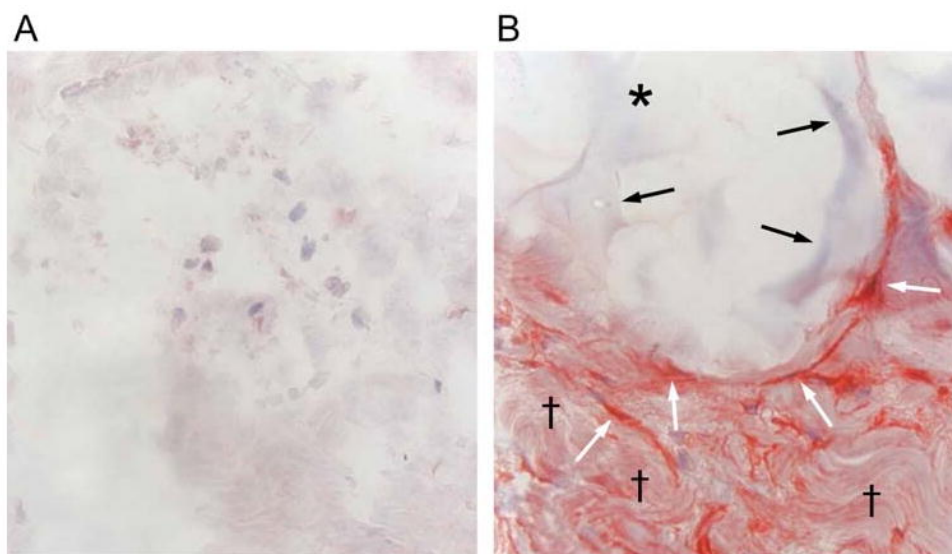
Lasersko pomlađivanje kože temelji se na nanošenju kontroliranih ozljeda na lokaliziranom području u koži, nakon čega slijedi upala i cijeljenje čime se potiče proizvodnja dermalnog kolagena pod utjecajem čimbenika rasta i citokina te strukturno remodeliranje dermisa (157). Rezultati laserkog pomlađivanja kože slični su onima postignutim topikalnom primjenom retinoida, vitamina C i čimbenika rasta. U slučaju neinvazivnog, neablacijskog laserskog postupka, topikalna primjena čimbenika rasta bi mogla pridonijeti ubrzanom ili poboljšanom procesu cijeljenja. Djelovanjem lasera mijenja se i barijerna funkcija kože što može dovesti do poboljšanja dermalne apsorpcije čimbenika rasta. Topikalna primjena

čimbenika rasta prije samog laserskog postupka bi također mogla biti vrlo učinkovita zbog pripreme kože za robusniji odgovor na laserski postupak (47).

#### 4.4.9 DERMALNI FILERI NA BAZI HIJALURONSKE KISELINE

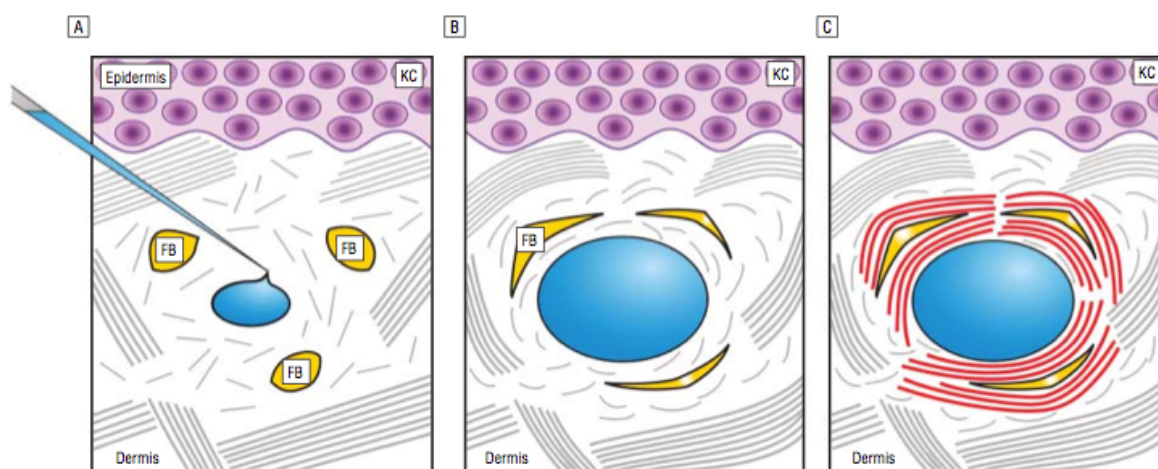
Starenjem zbog degenerativnih promjena fibroblasta i izvanstaničnog matriksa dolazi do gubitka volumena tkiva kože. Povećanjem volumena tkiva neinvazivnim postupcima koristeći biorazgradnjive nadopune mekog tkiva može se povratiti mladenački izgled licu popunjavajući duboke bore te smanjujući plitke bore (158). Prvi biomaterijal koji se koristio u tu svrhu tijekom 80.-ih godina dvadesetog stoljeća je bio goveđi kolagen. Danas postoje različiti pristupi i medicinski proizvodi koji za cilj imaju nadopunu mekog tkiva. Svojstva idealnog medicinskog proizvoda za nadopunu mekog tkiva uključuju biokompatibilnost, neimunogenost, odgovarajuću postojanost, biorazgradljivost te mogućnost uklanjanja iz organizma ako je potrebno. Vrlo je važan i izostanak migracije s mjesta primjene te prekomjerne upalne reakcije nakon primjene (159). Hijaluronsku kiselinu karakteriziraju skoro sva navedena idealna svojstva te su stoga medicinski proizvodi na bazi hijaluronske kiseline najviše korišteni u nadopuni mekog tkiva kože. Međutim, prirodna hijaluronska kiselina vrlo brzo se razgrađuje u organizmu (vrijeme polurazgradnje 12 h) te se stoga primjenjuje umrežena hijaluronska kiselina. Uz kontrolu brzine razgradnje, umrežavanjem hijaluronske kiseline poboljšavaju se i njezina mehanička svojstva (160). Umrežavanjem dolazi do geliranja te intradermalnom primjenom gela hijaluronske kiseline dolazi do povećanja volumena, elastičnosti i zategnutosti kože, poboljšanja hidracije kože te smanjenja bora. Učinak je ovisan o koncentraciji i molekulskoj masi hijaluronske kiseline te procesu i stupnju umrežavanja (143).

Povećanjem volumena dermisa, fibroblasti zauzimaju pozitivnu “rastegnutu” konformaciju te proizvode više kolagena, a manje MMP-ova (4). Ta hipoteza potvrđena je ispitivanjem neanimalne stabilizirane hijaluronske kiseline (Restylane®, Medicis Aesthetics Inc, Scottsdale, Arizona, SAD) u fotooštećenoj koži. Pokazano je da je proizvodnja kolagena značajno povećana na mjestima primjene te je taj učinak održan tijekom tri mjeseca (161). Brojni fibroblasti također su primijećeni na mjestu primjene. Ti fibroblasti imaju karakterističan izdužen izgled te izlučuju velike količine prokolagena tipa I. Povećana proizvodnja kolagena vezana je s povećanom razinom TGF- $\beta$  i čimbenika rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*, CTGF). Slični rezultati dobijeni su na zaštićenoj koži starijih osoba (80 i starijih) (neobjavljeni podaci) (4).



**Slika 17.** Mehaničko rastezanje koje izaziva intradermalna primjena umrežene hijaluronske kiseline stimulira proizvodnju kolagena u fotooštećenoj ljudskoj koži (preuzeto iz (4)). Fiziološka otopina (A) i umrežena hijaluronska kiselina injektirani su u fotooštećenu kožu nadlaktice. Uzorci kože su uzeti četiri tjedna nakon injekcije te je imunohistokemijski određen prokolagen tipa I. Fibroblasti (jezgre obojane u plavo) u koži injektiranoj fiziološkom otopinom imaju jedva primjetno izlučivanje prokolagena (crvena mrlja). U koži sa hijaluronskom kiselinom fibroblasti pokazuju intenzivnu proizvodnju prokolagena (crveno obojenje). Umrežena hijaluronska kiselina se vidi kao svijetlo plavi materijal (crne strelice) koji se nalazi u blizini rastegnutih fibroblasta (bijele strelice).

Rezultati tog istraživanja važni su iz dva razloga: (i) predstavljaju neposredan dokaz da mehanička napetost stimulira proizvodnju kolagena *in vivo* (slika 17) te (ii) predstavljaju *in vivo* potvrdu rezultata *in vitro* ispitivanja da fibroblasti fotootštećene i kronološki ostarjele kože imaju značajan kapacitet za proizvodnju novog kolagena kad se uklone iz njihovog *in vivo* oštećenog kolagenskog matriksa (4). Na slici 18 shematski je prikazan radni model mehaničke napetosti potaknute intradermalnom primjenom umrežene hijaluronske kiseline.



**Slika 18.** Radni model mehaničke napetosti potaknute intradermalnom primjenom umrežene hijaluronske kiseline (preuzeto iz (4)). Injektiranjem dermalnih filera te rezultirajućim povećanjem volumena dermisa, fibroblasti zauzimaju pozitivnu “rastegnutu” konformaciju te proizvode više kolagena (crvena vlakna obilježavaju novosintetizirani kolagen). KC, keratinociti; FB, fibroblasti.

#### 4.5 DERMATOKOZMETIČKI PRIPRAVCI ZA SPRJEČAVANJE I/ILI UBLAŽAVANJE PROMJENA KOJE SE JAVLJAJU STARENJEM DERMISA

Dermatokozmetički pripravci za sprječavanje i/ili ublažavanje promjena koje se javljaju starenjem moraju ispuniti visoke standarne potrošača, a koji uključuju učinkovitost i sigurnost te estetske karakteristike kao što su izgled, miris i osjećaj nakon primjene. Estetske karakteristike su ključne za prihvaćanje pripravka od strane potrošača. Tip i sastav formulacije potrebno je prilagoditi statusu (fotostarenje, kronološko starenje: prvi znakovi starenja, već nastale linije i bore), tipu (masna, suha) kože te posebnostima područja kože (koža lica, područja oko očiju te usnica, vrata). Ključni parametar koji formulacija treba osigurati je oslobađanje i permeacija kozmeceutika do mjesta njihovog učinka. Također, neophodno je osigurati kemijsku i mikrobiološku stabilnost pripravka. Stoga su ti dermatokozmetički pripravci vrlo složene formulacije, u kojima su u odgovarajuću podlogu ugrađeni kozmeceutici različitog mehanizma djelovanja te pomoćne tvari koje olakšavaju permeaciju kozmeceutika na mjesto učinka, osiguravaju odgovarajuća reološka i estetska svojstva pripravka te njegovu stabilnost. Nanotehnološkim pristupom pri oblikovanju dermatokozmetičkih pripravaka razvijaju se inovativni dermatokozmetički pripravci unaprijeđene učinkovitosti, sigurnosti, stabilnosti te stoga i unaprijeđene komercijalne vrijednosti.

##### 4.5.1 PERMEACIJA KOZMECEUTIKA U DERMIS

Učinkovitost topikalno primjenjenih kozmeceutika koji ublažavaju i/ili sprječavaju degenerativne promjene dermisa uzrokovane starenjem ograničena je njihovom permeacijom do mjesta učinka. U osnovi taj se problem ogleda u anatomske građi same kože. Od mjesta primjene pripravka do mjesta učinka nekoliko je značajnih fizičko-kemijskih

barijera i problema. Najznačajniju barijeru dermalnoj apsorpciji predstavlja vanjski rožnati sloj kože. Čimbenici koji određuju dermalnu apsorpciju su mjesto primjene (područje kože i površina), integritet *stratum corneum* i debljina epidermisa. Nakon difuzije kroz rožnati sloj, kozmeceutik mora permeirati kroz žive slojeve epidermisa pri tome minimalno ulazeći u interakciju s keratinocitima i enzimima. Zatim mora prijeći bazalnu membranu te tek pod uvjetom da je izbjegao eliminaciju mikrovaskulaturom dermisa, kozmeceutik postaje raspoloživ za učinak u dermisu. Bioraspoloživost topikalnih dermatokozmetičkih pripravaka određena je svojstvima kozmeceutika, svojstvima podloge te sastavom i svojstvima formulacije. Ključna svojstva kozmeceutika su lipofilnost, veličina i naboj molekule, topljivost u podlozi te metabolička stabilnost. Formulacijski parametri određeni su vrstom podloge te vrstom i udjelima pomoćnih tvari u dermatokozmetičkom pripravku. Pomoćne su tvari bitan čimbenik bioraspoloživosti kozmeceutika iz dermatokozmetičkog pripravka zbog njegove izravne primjene na površinu kože odnosno apsorpcijsku površinu.

## BARIJERE KOŽE

Jedna od glavih uloga kože je učinkovita i selektivna zaštita organizma od ulaska kemijskih tvari. Rožnati sloj najznačajnija je barijera dermalnoj apsorpciji te određuje njenu brzinu i obim. Građen je od spljoštenih, koplanarnih i mrtvih keratiziranih stanica, korneocita, debljine 0,1 do 0,5  $\mu\text{m}$  koji su vertikalno organizirani u penta do heptagonalne stupce. Svaki stupac građen je od 15 do 22 sloja stanica uklopljenih u specijalizirani i dobro organizirani lipidni matriks. Korneociti koji čine pet do sedam stupaca organiziranih u skupinu preklapaju se lateralnim rubovima čime je ojačana kohezija među stanicama te pojačana barijera kože (162). Debljina međustaničnog prostora u rožnatom sloju iznosi manje od 100 nm, osim na mjestima između klustera stanica (što može uključivati i fine bore, gdje debljina može biti od

nekoliko mikrometara te duboke bore), u površinska dva do tri sloja stanica (gdje su stanice manje gusto pakirane te se ljušte s površine kože) te prva dva do tri sloja stanica rožnatog sloju (uz zrnati sloj, *stratum granulosum*, gdje započinje proces terminalne diferencije stanica). Stoga je barijera kože najizraženija na otprilike polovici debljine rožnatog sloja (162).

Izvanstanični prostor rožnatog sloja čini lipidni matriks, većinom u kristaliničnom stanju te organizirane multilamelarne strukture (163). Koplanarne lipidne multilamelarne strukture građene su najčešće od osam (pa do deset) pojedinačnih slojeva koje su lateralno povezane s tanjim lipidnim zonama građanim od dva, četiri ili šest lipidnih slojeva. Te tanje zone dulje su i obilnije na periferiji korneocita.

Rožnati sloj razlikuje se od ostatka epidermisa po tome što ga čine dva odjeljka, mrtve keratizirane stanice (korneociti) i međustanični lipidni matriks. Formulacija/pomoćne i aktivne tvari mogu utjecati na permeabilnost kože različitim mehanizmima uključujući delipidizaciju, hidraciju, fluidizaciju i disrupciju korneodezmosoma (funkcioniraju kao "zakovice" koje drže korneocite na okupu) u rožnatom sloju. Ti procesi mogu promijeniti polarnost formulacije što onda utječe na topljivost i termodinamičku aktivnost tvari koja permeira. To utječe na raspodjelu tvari iz podloge u rožnati sloj.

Hidrofilna svojstva kože povećavaju se kako se povećava dubina od površine kože, tako da su živi slojevi epidermisa, koje predstavljaju *stratum granulosum*, *stratum spinosum* i *stratum basale*, u biti hidrofilni slojevi kože. Dermis je također hidrofilan, što znači da se preferira permeacija hidrofilnih tvari.

## APSORPCIJA U KOŽU

Pretpostavljaju se dva glavna puta apsorpcije tvari kroz rožnati sloj: (i) naizmjenični transport kroz međustanični lipidni matriks i korneocite, (ii) kontinuirani transport kroz međustanični lipidni matriks (164). Male i lipofilne molekule apsorbiraju se preko međustaničnog lipidnog matriksa, dok se hidrofilne molekule pretežno apsorbiraju transportom preko korneocita. Zanimljivo je da su područja bora područja s najviše nepravilnosti u pakiranju međustaničnih lipida i korneocita te stoga baš ta područja predstavljaju najslabiju barijeru permeaciji hidrofilnih tvari u kožu (162).

Aktivni i olakšani transport kroz rožnati sloj se ne odvijaju, zbog toga što su korneociti anuklearni i keratinizirani i ne mogu proizvoditi proteinske strukture odgovorne za aktivni ili olakšani transport (165). Stoga se smatra da je glavni mehanizam transporta kroz rožnati sloj difuzija opisana prvim Fickovim zakonom (166).

$$J = (P \times D \times \Delta C) / h$$

pri čemu je J fluks, P je koeficijent razdjeljenja između kože i podloge, D je koeficijent difuzije kroz kožu,  $\Delta C$  je koncentracijski gradijent kroz kožu i h je debljina kože. Parametar koji se najčešće koristi u predviđanju permeabilnosti kroz kožu je koeficijent permeabilnosti ( $k_p$ ) definiran kao  $k_p = (P \times D) / h$ .

Optimalna svojstva aktivnih tvari za uspješnu dermalnu primjenu uključuju  $\log P_{\text{oktanol/voda}}$  od 1 do 3, molekulska masa manja od 500, topljivost u vodi veća od 100  $\mu\text{g/mL}$ , talište manje od 200°C i manje od 4 polarna centra u molekuli. S povećanjem lipofilnosti poboljšava se, dok s povećanjem molekulske mase smanjuje se permeacija kroz kožu. Međutim, iznad optimalne lipofilnosti, permeacija se smanjuje zbog hidrofilne prirode živih slojeva epidermisa te hidrofilne prirode dermisa.



Iako je difuzija kroz rožnati sloj glavni put apsorpcije za većinu tvari, apsorpcija se može odvijati kroz folikul dlake ili znojne žlijezde. Uz to, sve više dokaza upućuje na postojanje drugih hidrofilnih transepidermalnih putova koje predstavljaju važnu ulogu u transportu hidrofilnih i amfifilnih molekula (162).

## MOGUĆE INTERAKCIJE U KOŽI

Sudbina kozmeceutika nakon kontakta s kožom uključuje isparavanje s površine kože, raspodjelu u rožnati sloj koji slijedi reverezibilno ili ireverzibilno vezanje, permeaciju u dublje slojeve epidermisa koju slijedi metabolizam ili permeacija u dermis, te moguća nepoželjna apsorpcija u sistemsku cirkulaciju ili vezanje za okolna tkiva.

Tijekom izlaganja kože dermatokozmetičkom pripravku, moguće su složene interakcije između kozmeceutika, podloge i kože, koje mogu utjecati na savladavanje barijera kože te difuziju kroz kožu (167). Te interakcije se mogu javiti istovremeno i mogu se svrstati prema mjestu događaja: površina kože, rožnati sloj, živi slojevi epidermisa i dermis.

Na površini kože može doći do promjene topljivosti kozmeceutika (što rezultira taloženjem ili otapanjem kozmeceutika), isparavanja tvari te fizičko-kemijskih promjena formulacije. Tvari prisutne u formulaciji mogu djelovati neovisno jedna od druge, ali prisutnost jedne tvari može utjecati i na učinak druge. Također, kad se kozmeceutik primjeni u obliku složene formulacije, tada količina slobodne tvari raspoloživa za apsorpciju može biti značajno promijenjena. Koncentracijski gradijent potreban za difuziju može biti umanjen zbog kemijskih interakcija kozmeceutika s površinom kože, dlakama, sebumom i znojem.

U rožnatom sloju ključne su interakcije pospješivača apsorpcije s lipidnim matriksom koje uključuju narušavanje njegove organizacije, a čime se poboljšava raspodjela kozmeceutika u dublje slojeve (168).

Jedna od mogućih interakcija u živim slojevima epidermisa je biotransformacija kozmeceutika. Indukcija ili inhibicija enzima uključenih u metabolizam moguća je pri primjeni složenih formulacija. Drugi enzimi odgovorni za strukturu i funkciju kože također mogu biti pogođeni, primjerice enzimi uključeni u sintezu lipida te stoga može doći do narušavanja barijerne funkcije kože. Nadalje, određene tvari mogu potaknuti keratinocite na oslobađanje proupalnih citokina što može utjecati na barijernu funkciju rožnatog sloja ili vaskularnu funkciju dermisa te modulirati aktivnost enzima uključenih u biotransformaciju.

U dermisu kozmeceutici mogu neposredno ili posredno (preko citokina oslobođenih u epidermisu i dermisu) utjecati na dubinu i obim apsorpcije drugih kozmeceutika u formulaciji.

#### 4.5.2 PRISTUPI ZA POBOLJŠANJE BIORASPOLOŽIVOSTI KOZMECEUTIKA U DERMISU

Pristup za poboljšanje bioraspoloživosti kozmeceutika u dermisu ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima kozmeceutika te može uključivati: (i) modifikaciju same molekule kozmeceutika s ciljem poboljšanja lipofilnosti i/ili stabilnosti, (ii) dodatak pospješivača apsorpcije u formulaciju, (iii) uklapanje kozmeceutika u nosače nanometarskih dimenzija.

Kao dobar primjer za pojašnjenje potreba i pristupa za poboljšanje bioraspoloživosti nameću se peptidi. Peptidi su molekule uglavnom velike molekulske mase i pri fiziološkom pH su nabijeni te stoga hidrofilne prirode. Posljedično tome peptide karakterizira niska permeabilnost kroz kožu čime je značajno ograničena topikalna primjena kozmeceutika peptidne strukture s mjestom učinka u dermisu (169, 170). Pospješivači apsorpcije koji se najčešće koriste u formulacijama kozmeceutika peptidne strukture su masne kiseline. Masne kiseline uz ceramide i kolesterol su glavne sastavnice lipidnog matriksa rožnatog sloja. Mehanizmi kojim masne kiseline pospješuju dermalnu apsorpciju uključuju: (i)

povećanje fluidnosti lipidnog matriksa rožnatog sloja (ii) povećanje dermalne raspodjele tvari koja permeira te (iii) povećanje transporta otapala u koži ili kroz kožu (171).

Modifikacije peptidne molekule s ciljem povećanja dermalne bioraspoloživosti također uključuju vezanje masnih kiselina. Većina peptida koja se koristi u dermatokozmetičke svrhe, a s mjestom učinka u dermisu, najčešće je modificirana vezanjem palmitinske kiseline na molekulu peptida. Vezanjem palmitinske kiseline na N-kraj peptida KTTKS (N-palmitoil-KTTKS, pal-KTTKS) povećana je lipofilnost molekule ( $\log P$  KTTKS i pal-KTTKS iznosi -3,27 i 3,32) te je koeficijent permeabilnosti porastao 17 puta u odnosu na koeficijent permeabilnosti nemodificiranog KTTKS (20). pal-KTTKS komercijalno je dostupan u obliku otopine zaštićenog imena Matrixyl™ (172).

Nadalje, peptidi su zbog svoje prirode podložni razgradnji u samoj formulaciji ali i enzimskoj razgradnji u živim slojevima epidermisa te dermisu. Modifikacijom peptidne molekule može se poboljšati njezina stabilnost. Dobar primjer je drugi derivat KTTKS peptida kojem je pospješena dermalna bioraspoloživost konjugacijom s L-askorbinskom kiselinom (poznat kao stabilizirani askorbil-pentapeptid (SAP) (173)). Patentirala ga je korejska tvrtka Pepton Co., LTD. (Daejeon, Južna Koreja) pod imenom Ascotide™ (20, 174). Dokazan je bolji učinak tog konjugata u stimulaciji fibroblasta *in vitro*, što rezultira povećanom proizvodnjom kolagena (173). Također, konjugat je otporniji na enzimatsku razgradnju *in vitro* u usporedbi s nemodificiranim KTTKS. Stoga se smatra da je pospješena dermalna bioraspoloživost posljedica povećane stabilnosti konjugata u usporedbi s nemodificiranim KTTKS (20, 173).

Uklapanjem peptida u odgovarajuće nanonosače također se može poboljšati njihova stabilnost te apsorpcija u dermis.

## POSPJEŠIVAČI APSORPCIJE

Do danas, ispitivan je potencijal velikog broja različitih tvari s ciljem poboljšanja apsorpcije kozmeceutika i lijekova pri topikalnoj primjeni na kožu (168). Međutim, mehanizmi u podlozi poboljšanja apsorpcije niti sigurnost njihove primjene nisu u potpunosti razjašnjeni. Mogući mehanizmi (spomenuti ranije) uključujuću delipidizaciju, hidraciju, fluidizaciju i disrupciju korneodezmosoma u rožnatom sloju. Ključno je da pospješivači apsorpcije nisu toksični te ne izazivaju iritaciju ili alergijske reakcije. Kao najčešći pospješivači apsorpcije koriste se voda, sulfoksidi, azon, pirolidoni, masne kiseline, alkoholi, viši masni alkoholi i glikoli, površinski aktivne tvari, urea te eterična ulja.

### 4.5.3 INOVATINI DERMATOKOZMETIČKI PRIPRAVCI

Dermatokozmetička industrija lider je u komercijalizaciji inovativnih pripravaka koji se temelje na tehnologiji uklapanja aktivnih tvari u nosače nanometarskih dimenzija. Pri tome, najviše pažnje je usmjereno na razvoj dermakozmetičkih pripravaka za ublažavanje promjena koje se javljaju starenjem u dermisu, a zbog potrebe savladavanja fizičko-kemijskih barijera do mjesta učinka kozmeceutika (175).

Glavne prednosti korištenja nanonosača pri oblikovanju dermatokozmetičkih pripravaka su:

(i) poboljšana dermalna bioraspoloživost kozmeceutika u određenom sloju kože, (ii) optimalno iskorištenje skupih kozmeceutika, (iii) poboljšana stabilnost kozmeceutika, (iv) kontrolirano oslobađanje kozmeceutika sa smanjenom mogućnosti iritacije kože, (v) olakšano nanošenje i uklanjanje dermatokozmetičkog pripravka (176, 177).

Nanonosači obuhvaćaju čestice različite građe, oblika, površinskih svojstava i raspodjele veličina unutar nanometarskog područja dimenzija (< 1000 nm). Osnovne fizičke značajke su

im veliki omjer površine i volumena, kao i veliki broj čestica po jedinici površine. Nanočestice s uklopljenim kozmeceuticima za dermalnu primjenu moraju se zadržati na ili unutar pojedinih slojeva kože bez sistemskog učinaka kako se ne bi prešla granica dermatokozmetičkog i transdermalnog ljekovitog pripravka (162, 178). Danas su tržišno dostupni brojni dermatokozmetički pripravci s različitim kozmeceuticima uklopljenim u nanonosače.

Priprava inovativnih oblika za dermalnu primjenu kozmeceutika uključuje njihovo uklapanje u nanonosače te s tim povezani izazovi povećanja učinkovitosti uklapanja i postizanja zadovoljavajuće stabilnosti nanonosača u konačnom obliku s ciljem njegove optimalne stabilnosti i primjerenog roka valjanosti.

## LIPOSOMI

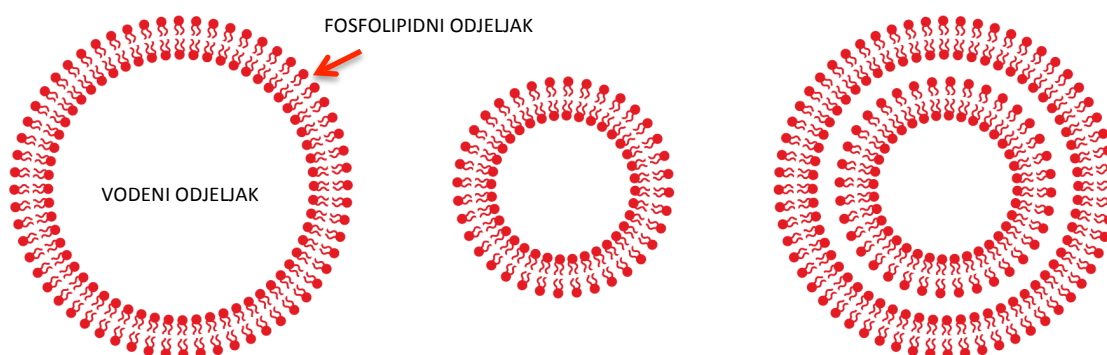
Liposomi su najčešće korišteni nanonosači s uklopljenim kozmeceuticima. To su vezikule nanometarskih dimenzija građeni od fosfolipida, amfifilnih molekula koje se u vodenoj sredini samoorganiziraju u fosfolipidne dvosloje sferičnog oblika. Hidrofobni nepolarni dijelovi molekula fosfolipida usmjereni su prema unutrašnjoj, dok su polarne glave fosfolipida orijentirane prema vanjskoj strani sferične lamelarne strukture. Ovisno o vrsti fosfolipida i metodama priprave liposomi su građeni iz jedanog (unilamelarni: mali 20-100 nm, veliki > 100 nm) ili više slojeva (multilamelarni > 100 nm) (slika 19).

Ovisno o polarnosti, kozmeceutici se uklapaju u fosfolipidni ili vodeni odjeljak liposoma. Hidrofobni kozmeceutici uklapaju se u fosfolipidni, hidrofilni kozmeceutici uklapaju u vodeni odjeljak, dok amfifilni kozmeceutici zauzimaju neke od prijelaznih položaja između fosfolipidnih i vodenih odjeljaka liposoma.

Uklapanjem kozmeceutika u liposome povećava se topljivost i/ili stabilnost takvih tvari te se može poboljšati njihovo prodiranje u dublje slojeve kože. Naime, fosfolipidni dvosloj pridonosi međudjelovanju liposoma s lipidnim površinskim slojem kože (177). Liposomi se dobro spajaju s membranama stanica pri čemu se oslobađa uklopljeni kozmeceutik.

Prednosti liposoma su njihova netoksičnost, neimunogenost i biorazgradivost. Nedostatak liposoma je rigidnost čime je ograničeno njihovo prodiranje kroz kožu te njihova fizička i/ili kemijska nestabilnost, čime je ograničen rok valjanosti dermatokozmetičkih pripravaka temeljenih na liposomima.

Različiti kozmeceutici koji potiču sintezu kolagena te imaju druge blagotvorne učinke na dermis uklapani su u liposome (179, 180). Tvrtka Dior je 1986. godine prva uvela na tržište dermatokozmetički pripravak s liposomima (Capture®) (178). Danas na tržištu ima veliki broj pripravaka temeljenih na liposomima koji se koriste za prevenciju ili ublažavanje promjena koje se javljaju starenjem (175, 176).

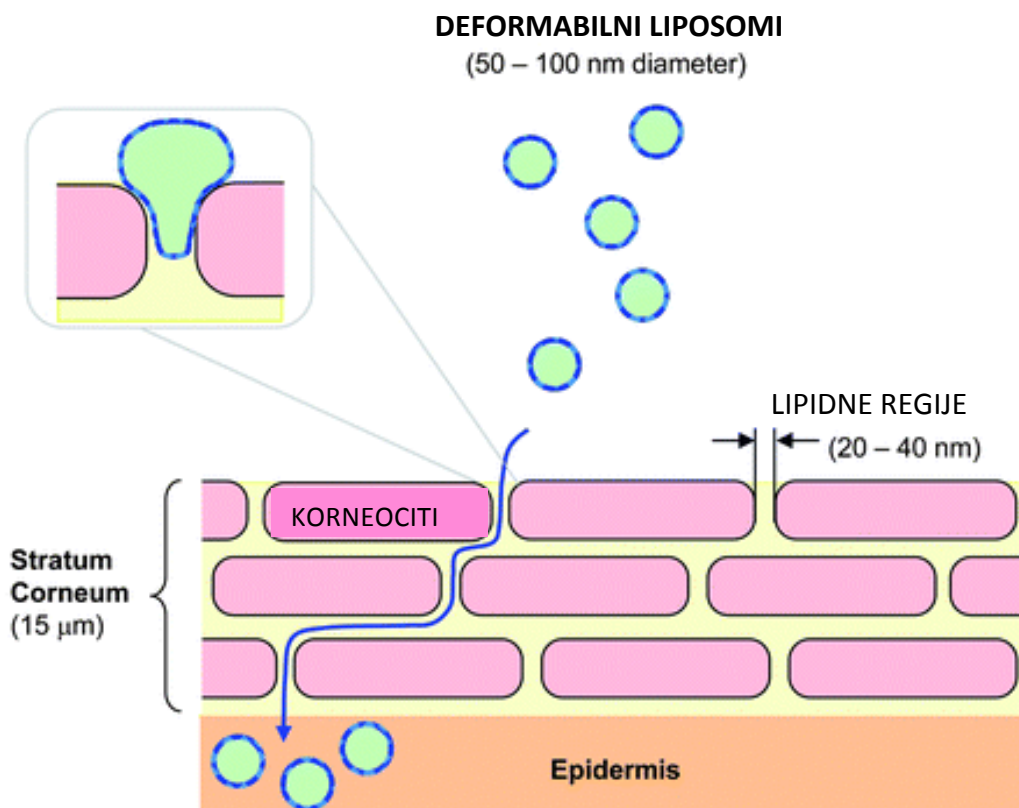


**Slika 19.** Shematski prikaz strukture unilamelarnih velikih i malih liposoma te multilamelarnih liposoma.

#### DEFORMABILNI LIPOSOMI

Deformabilni liposomi prilagođeni su liposomi razvijeni s ciljem daljnjeg poboljšanja prijenosa kozmeceutika do određenih slojeva kože (162, 176, 181). Izrađeni su pretežno od

fosfolipida uz dodatak rubnog aktivatora što rezultira stvaranjem deformabilnog dvosloja. Zbog povećane elastičnosti membrane deformabilnih liposoma povećana je njihovo prodiranje kroz rožnati sloj prema dubljim slojevima kože. Većim dijelom prolaze rožnati sloj kože putem pora, a manjim dijelom oslanjajući se na pasivnu difuziju.



**Slika 20.** Prodiranje deformabilnih liposoma prema dubljim slojevima kože (preuzeto iz (182)).

Kompozicija vezikula određuje njihovu veličinu, naboj, lamelarnost, elastičnost i fluidnost fosfolipidnog dvosloja. Svi ti čimbenici utječu na mogućnosti deformacije vezikule što u konačnici određuje učinkovitost dermalne apsorpcije vezikule s uklopljenom djelatnom tvari i/ili oslobođene djelatne tvari nakon raspada vezikule. Najčešće sadrže površinski aktivne tvari (10-25%, m/m) i etanol (etosomi, 3-10%, m/m).

Deformabilni su liposomi učinkoviti nosači kozmeceutika namijenjenih dermisu kože, a njihovi nedostaci uključuju kemijsku i fizičku nestabilnost jednaku nestabilnosti liposoma.

## LIPIDNE NANOČESTICE

Istraživanje i razvoj čvrstih lipidnih nanočestica započelo je s ciljem razvoja sustava poboljšanih svojstava u odnosu na liposome. Fizički i kemijski su stabilnije, a osiguravaju i bolju stabilnost uklopljenog kozmeceutika u odnosu na liposome, čime se osigurava zadovoljavajući rok valjanosti takvih dermatokozmetičkih pripravaka temeljenih na lipidnim nanočesticama.

Čvrste lipidne nanočestice (*engl.* solid lipid nanoparticles) disperzija su čvrstih lipida u vodi, stabilizirana s emulgatorima/koemulgatorima (178). Veličina nanočestica je u rasponu od 40-1000 nm i s povećavanjem se udjela lipida se povećava. Čvrste lipidne nanočestice građene su pretežno od fizioloških i biorazgradivih lipida. O sastavu lipida ovisi interakcija s lipidima rožnanog sloja te posljedično i apsorpcija kozmeceutika u dublje slojeve kože. Čvrste lipidne nanočestice koriste se kao nosači brojnih kozmeceutika (npr. retinol, retinil-palmitat, vitamin E, tokoferol-acetat, koenzim Q10) prvenstveno zbog poboljšavanja njihove dermalne apsorpcije.

Nanostrukturirani lipidni nosači (*engl.* nanostructured lipid carriers) smjesa su čvrstih i tekućih lipida u omjerima od 70:30 do 99,9:0,1. Izrađuju se u obliku disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača u vodenoj sredini. Prednost pred čvrstim lipidnim nanočesticama očituje se većem uklapanju kozmeceutika te boljoj inkluziji kozmeceutika unutar lipidnog matriksa što dodatno produljuje rok valjanosti pripravka. Tvrtka Dr. Rimpler GmbH (Njemačka) je 2005. godine uvela na tržište prva dva dermatokozmetička pripravka s



nanostrukturiranim lipidnim nosačima (NanoRepair Q 10 krema i NanoRepair Q 10 serum) ((178).

## MIKROEMULZIJE

Mikroemulzije su termodinamički stabilne disperzije dvije tekuće faze koje se međusobno ne miješaju, uz dodatak emulgatora i koemulgatora koji stabiliziraju mikroemulzijski sustav (176). Veličina kapljica disperzne faze mikroemulzije je 20-200 nm. U okvirima tog područja veličina kapljica disperzne faze sustavi veličina < 100 nm nazivaju se nanoemulzije. Mikroemulzije su transparentni sustavi u usporedbi s mliječno bijelim izgledom (makro)emulzije. Velikog su kapaciteta uklapanja kozmeceutika. Hidrofobni kozmeceutici uklapaju se u mikroemulzije tipa U/V, dok se hidrofilni uklapaju u mikroemulzije tipa V/U. Uklopljeni kozmeceutici otopljeni su u disperznoj fazi mikroemulzije.

Mikroemulzije imaju mnoge prednosti pred (makro)emulzijama. Glavne prednosti mikroemulzija su: (i) učinkovita opskrba kože lipidima i vlagom, (ii) privlačna kozmetička svojstva (izgled) zbog uporabe novih sirovina i tehnologija izrade, (iii) uklapanje relativno velike količine kozmeceutika u disperznu fazu, (iv) poboljšana dermalna apsorpcija različitih kozmeceutika omogućena je učinkom površinski aktivnih tvari (PAT) kao pospješivača apsorpcije, izrazitom hidratacijom površinskog sloja kože i povećanom adhezijom zbog nanometarskih dimenzija disperzne faze i relativno niskom površinskom napetošću sustava (slika 3). Istodobno, nedostaci mikroemulzija posljedica su njihovog sastava, tj. visokog udjela PAT koji je nužan za njihovu pripravu, a s kojim su povezane mogućnosti iritacija kože.

## 5 ZAKLJUČAK

Starenje kože je vrlo složen degenerativni proces koji je posljedica međudjelovanja brojnih molekulskih i staničnih mehanizama. Propadanje kolagenskog matriksa dermisa kože karakteristična je osobina kronološki ostarjele kože, a ta je promjena ubrzana kod fotooštećene kože. Kolagen se jako sporo obnavlja te tijekom starenja dolazi do nakupljanja djelomično razgrađenog/fragmentiranog kolagena što narušava integritet kolagenskog matriksa i funkciju fibroblasta. U organizaciji i održavanju kolagenskog matriksa ključnu ulogu igra mehanička napetost fibroblasta odgovornih za sintezu kolagena. Smanjenje mehaničke napetosti koje se javlja starenjem kritična je pokretačka sila molekularnih promjena u podlozi starenja kože.

Otkriće da fibroblasti fotooštećene i kronološki ostarjele kože imaju značajan kapacitet proizvodnje novog kolagena kada ih se ukloni iz njihovog fragmentiranog izvanstaničnog matriksa predstavlja osnovu za razvoj novih dermatokozmetičkih pristupa u prevenciji i usporavanju degenerativnih procesa starenja. Iako postoji mnoštvo kozmeceutika za koje se tvrdi da poboljšavaju izgled i funkciju ostarjele i/ili fotooštećene kože, samo je mali broj njih primjereno ispitan te određen mehanizam njihovog djelovanja. Retinoidi su zasad najučinkovitiji u sprječavanju degenerativnih promjena dermisa, a vrlo važnu skupinu predstavljaju i peptidi koji stimuliraju aktivnost fibroblasta te potiču proizvodnju kolagena. Učinkovitost topikalno primjenjenih kozmeceutika koji ublažavaju i/ili sprječavaju degenerativne promjene dermisa ograničena je njihovom permeacijom do mjesta učinka. Pristup za poboljšanje bioraspoloživosti kozmeceutika u dermisu ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima kozmeceutika te može uključivati: (i) modifikaciju same molekule kozmeceutika s ciljem poboljšanja lipofilnosti i/ili stabilnosti, (ii) dodatak pospješivača apsorpcije u formulaciju, (iii) uklapanje kozmeceutika u nosače nanometarskih dimenzija.

## 6 LITERATURA

1. Kirkwood TB, Boys RJ, Gillespie CS, Proctor CJ, Shanley DP, Wilkinson DJ. Towards an e-biology of ageing: integrating theory and data. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(3):243-9.
2. Yaar M, Eller MS, Gilchrest BA. Fifty years of skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2002;7(1):51-8.
3. Fligiel SE, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J Invest Dermatol.* 2003;120(5):842-8.
4. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol.* 2008;144(5):666-72.
5. Hwang KA, Yi BR, Choi KC. Molecular mechanisms and in vivo mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations. *Lab Anim Res.* 2011;27(1):1-8.
6. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 2002;138(11):1462-70.
7. Farage MA, Miller KW, Maibach HI. Degenerative changes in aging skin. In: Farage MA, Miller KW, Maibach HI, editors. *Textbook of aging skin.* Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2010. p. 25-35.
8. Čajkovec M. *Kozmetologija.* Jastrebarsko: Naklada slap; 2005.
9. Naylor EC, Watson RE, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas.* 2011;69(3):249-56.
10. Makrantonaki E, Zouboulis CC. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). *Exp Gerontol.* 2007;42(9):879-86.
11. Carneiro J, Junqueira LC. *Osnove histologije: udžbenik i atlas prema 10. američkom izdanju.* Zagreb: Školska knjiga; 2005.
12. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531-46.
13. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.
14. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 1996;379(6563):335-9.
15. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.* 1997;337(20):1419-28.
16. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74(2):111-22.
17. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2000;275(50):39027-31.
18. Yaar M, Gilchrest BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol.* 2007;157(5):874-87.
19. Langton AK, Sherratt MJ, Griffiths CE, Watson RE. A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing. *Int J Cosmet Sci.* 2010.
20. Abu Samah NH, Heard CM. Topically applied KTTKS: a review. *Int J Cosmet Sci.* 2011;33(6):483-90.

21. Kligman AM. Early destructive effect of sunlight on human skin. *JAMA*. 1969;210(13):2377-80.
22. Callaghan TM, Wilhelm KP. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part 2: Clinical perspectives and clinical methods in the evaluation of ageing skin. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(5):323-32.
23. Sudel KM, Venzke K, Mielke H, Breitenbach U, Mundt C, Jaspers S, et al. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol*. 2005;81(3):581-7.
24. Uitto J. Understanding premature skin aging. *N Engl J Med*. 1997;337(20):1463-5.
25. Krutmann J, Gilchrest BA. Photoaging of skin. In: Gilchrest BA, Krutmann J, editors. *Skin Aging*. New York: Springer; 2006. p. 33-44.
26. Polefka TG, Meyer TA, Agin PP, Bianchini RJ. Effects of solar radiation on the skin. *J Cosmet Dermatol*. 2012;11(2):134-43.
27. Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins MJ. Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br J Dermatol*. 2003;149(5):951-9.
28. Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(7):735-55.
29. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*. 2002;11(5):398-405.
30. Ghersetich I, Lotti T, Campanile G, Grappone C, Dini G. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int J Dermatol*. 1994;33(2):119-22.
31. Timar F, Soos G, Szende B, Horvath A. Interdigitation index - a parameter for differentiating between young and older skin specimens. *Skin Research and Technology*. 2000;6(1):17-20.
32. Oikarinen A. The aging of skin: chronoaging versus photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1990;7(1):3-4.
33. Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol*. 1986;15(4 Pt 1):571-85.
34. Talwar HS, Griffiths CE, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol*. 1995;105(2):285-90.
35. Craven NM, Watson RE, Jones CJ, Shuttleworth CA, Kielty CM, Griffiths CE. Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br J Dermatol*. 1997;137(3):344-50.
36. Schwartz E, Cruickshank FA, Christensen CC, Perlish JS, Lebwohl M. Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. *Photochem Photobiol*. 1993;58(6):841-4.
37. Oikarinen A, Kallioinen M. A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin. *Photodermatol*. 1989;6(1):24-31.
38. Smith JG, Jr., Davidson EA, Tindall JP, Sams WM, Jr. Hexosamine and hydroxyproline alterations in chronically sun-damaged skin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1961;108:533-5.
39. Robert C, Lesty C, Robert AM. Ageing of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis. *Gerontology*. 1988;34(5-6):291-6.
40. Watson RE, Griffiths CE, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol*. 1999;112(5):782-7.

41. Kadoya K, Sasaki T, Kostka G, Timpl R, Matsuzaki K, Kumagai N, et al. Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis. *Br J Dermatol*. 2005;153(3):607-12.
42. Bernstein EF, Underhill CB, Hahn PJ, Brown DB, Uitto J. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br J Dermatol*. 1996;135(2):255-62.
43. Sachs DL, Voorhees JJ. Age-reversing drugs and devices in dermatology. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(1):34-43.
44. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;973:31-43.
45. Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. Skin ageing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(8):873-84.
46. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol*. 1989;21(3 Pt 2):610-3.
47. Mehta RC, Fitzpatrick RE. Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatol Ther*. 2007;20(5):350-9.
48. Fitzpatrick RE, Goldman MP, Satur NM, Tope WD. Pulsed carbon dioxide laser resurfacing of photo-aged facial skin. *Arch Dermatol*. 1996;132(4):395-402.
49. Warren R, Gartstein V, Kligman AM, Montagna W, Allendorf RA, Ridder GM. Age, sunlight, and facial skin: a histologic and quantitative study. *J Am Acad Dermatol*. 1991;25(5 Pt 1):751-60.
50. Kligman LH, Kligman AM. The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol*. 1986;3(4):215-27.
51. Lavker RM. Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. In: Gilchrest BA, editor. *Photoaging*. Cambridge, MA: Blackwell Science; 1995. p. 123–35.
52. Glogau RG. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. *Semin Cutan Med Surg*. 1996;15(3):134-8.
53. McCallion R, Li Wan Po A. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther*. 1993;18(1):15-32.
54. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 2003;13(5):264-9.
55. Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*. 1998;16(7):387-98.
56. Reiser KM, Last JA. Biosynthesis of collagen crosslinks: in vivo labelling of neonatal skin, tendon, and bone in rats. *Connect Tissue Res*. 1986;14(4):293-306.
57. Monnier VM, Mustata GT, Biemel KL, Reihl O, Lederer MO, Zhenyu D, et al. Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on "a puzzle nearing resolution". *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:533-44.
58. Rittie L, Berton A, Monboisse JC, Hornebeck W, Gillery P. Decreased contraction of glycosylated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264(2):488-92.
59. Brakebusch C, Fassler R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J*. 2003;22(10):2324-33.
60. Ruoslahti E. Stretching is good for a cell. *Science*. 1997;276(5317):1345-6.
61. Delon I, Brown NH. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(1):43-50.

62. Lapiere CM. The ageing dermis: the main cause for the appearance of 'old' skin. *Br J Dermatol.* 1990;122 Suppl 35:5-11.
63. Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 2006;20(7):811-27.
64. Varani J, Schuger L, Dame MK, Leonard C, Fligiel SE, Kang S, et al. Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J Invest Dermatol.* 2004;122(6):1471-9.
65. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SE, Kang S, Fisher GJ, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol.* 2006;168(6):1861-8.
66. Varani J, Spearman D, Perone P, Fligiel SE, Datta SC, Wang ZQ, et al. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol.* 2001;158(3):931-42.
67. Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, et al. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol.* 2000;114(3):480-6.
68. Fisher GJ, Talwar HS, Lin JY, Lin PP, McPhillips F, Wang ZQ, et al. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *Journal of Clinical Investigation.* 1998;101(6):1432-40.
69. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
70. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(15):1475-85.
71. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481(7381):287-94.
72. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet.* 1989;1(8639):642-5.
73. Ameur A, Stewart JB, Freyer C, Hagstrom E, Ingman M, Larsson NG, et al. Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: mutational patterns and their origins. *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1002028.
74. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000;16(6):239-44.
75. Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, et al. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem.* 1999;274(22):15345-9.
76. Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell.* 2012;11(4):694-703.
77. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell.* 2012;148(1-2):46-57.
78. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev.* 2011;10(2):205-15.
79. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science.* 2011;333(6046):1109-12.
80. Harman D. The Free Radical Theory of Aging: Effect of Age on Serum Copper Levels. *J Gerontol.* 1965;20:151-3.

81. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 2011;21(10):569-76.
82. de Jesus BB, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *Embo Molecular Medicine.* 2012;4(8):691-704.
83. Wang K, Klionsky DJ. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy.* 2011;7(3):297-300.
84. Calabrese V, Cornelius C, Cuzzocrea S, Iavicoli I, Rizzarelli E, Calabrese EJ. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Aspects Med.* 2011;32(4-6):279-304.
85. Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. *Mol Cell.* 2010;40(2):333-44.
86. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, et al. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.* 2010;11(6):554-65.
87. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010;24(22):2463-79.
88. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
89. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):72-6.
90. Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell.* 2009;5(3):279-89.
91. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY).* 2012;4(3):166-75.
92. Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev.* 2007;21(24):3244-57.
93. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell.* 2012;11(2):345-9.
94. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239-47.
95. Zhuang L, Wang B, Sauder DN. Molecular mechanism of ultraviolet-induced keratinocyte apoptosis. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(5):445-54.
96. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati JB, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(3):361-73.
97. Camougrand N, Rigoulet M. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Respir Physiol.* 2001;128(3):393-401.
98. Sardy M. Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. *Connect Tissue Res.* 2009;50(2):132-8.
99. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci.* 2005;27(1):17-34.
100. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol.* 2004;165(3):741-51.
101. Bellemere G, Stamatias GN, Bruere V, Bertin C, Issachar N, Oddos T. Antiaging action of retinol: from molecular to clinical. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22(4):200-9.

102. Skazik C, Amann PM, Heise R, Marquardt Y, Czaja K, Kim A, et al. Downregulation of STRA6 expression in epidermal keratinocytes leads to hyperproliferation-associated differentiation in both in vitro and in vivo skin models. *J Invest Dermatol.* 2014;134(6):1579-88.
103. Jurzak M, Latocha M, Gojniczek K, Kapral M, Garncarczyk A, Pierzchala E. Influence of retinoids on skin fibroblasts metabolism in vitro. *Acta Pol Pharm.* 2008;65(1):85-91.
104. Varani J, Fisher GJ, Kang S, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of intrinsic skin aging and retinoid-induced repair and reversal. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1998;3(1):57-60.
105. Gold MH, Kircik LH, Bucay VW, Kiripolsky MG, Biron JA. Treatment of facial photodamage using a novel retinol formulation. *J Drugs Dermatol.* 2013;12(5):533-40.
106. Kircik LH. Safety and efficacy evaluation of tretinoin cream 0.02% for the reduction of photodamage: a pilot study. *J Drugs Dermatol.* 2012;11(1):83-90.
107. Kim H, Koh J, Baek J, Seo Y, Kim B, Kim J, et al. Retinyl retinoate, a novel hybrid vitamin derivative, improves photoaged skin: a double-blind, randomized-controlled trial. *Skin Res Technol.* 2011;17(3):380-5.
108. Kim JE, Kim B, Kim H, Kim H, Lee JD, Kim HJ, et al. Retinyl retinoate induces hyaluronan production and less irritation than other retinoids. *J Dermatol.* 2010;37(5):448-54.
109. Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Figueiro JF, et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *Int J Pharm.* 2014;473(1-2):591-8.
110. Raza K, Singh B, Lohan S, Sharma G, Negi P, Yachha Y, et al. Nano-lipoidal carriers of tretinoin with enhanced percutaneous absorption, photostability, biocompatibility and anti-psoriatic activity. *Int J Pharm.* 2013;456(1):65-72.
111. Griffiths CE, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *N Engl J Med.* 1993;329(8):530-5.
112. Cho S, Lowe L, Hamilton TA, Fisher GJ, Voorhees JJ, Kang S. Long-term treatment of photoaged human skin with topical retinoic acid improves epidermal cell atypia and thickens the collagen band in papillary dermis. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(5):769-74.
113. Kafi R, Kwak HS, Schumacher WE, Cho S, Hanft VN, Hamilton TA, et al. Improvement of naturally aged skin with vitamin A (retinol). *Arch Dermatol.* 2007;143(5):606-12.
114. Kurlandsky SB, Xiao JH, Duell EA, Voorhees JJ, Fisher GJ. Biological activity of all-trans retinol requires metabolic conversion to all-trans retinoic acid and is mediated through activation of nuclear retinoid receptors in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1994;269(52):32821-7.
115. Watson RE, Long SP, Bowden JJ, Bastrilles JY, Barton SP, Griffiths CE. Repair of photoaged dermal matrix by topical application of a cosmetic 'antiageing' product. *Br J Dermatol.* 2008;158(3):472-7.
116. Rona C, Vailati F, Berardesca E. The cosmetic treatment of wrinkles. *J Cosmet Dermatol.* 2004;3(1):26-34.
117. Green LJ, McCormick A, Weinstein GD. Photoaging and the skin. The effects of tretinoin. *Dermatol Clin.* 1993;11(1):97-105.
118. Bhawan J, Olsen E, Lufrano L, Thorne EG, Schwab B, Gilchrist BA. Histologic evaluation of the long term effects of tretinoin on photodamaged skin. *J Dermatol Sci.* 1996;11(3):177-82.



119. Olsen EA, Katz HI, Levine N, Nigra TP, Pochi PE, Savin RC, et al. Sustained improvement in photodamaged skin with reduced tretinoin emollient cream treatment regimen: effect of once-weekly and three-times-weekly applications. *J Am Acad Dermatol.* 1997;37(2 Pt 1):227-30.
120. Griffiths CE, Kang S, Ellis CN, Kim KJ, Finkel LJ, Ortiz-Ferrer LC, et al. Two concentrations of topical tretinoin (retinoic acid) cause similar improvement of photoaging but different degrees of irritation. A double-blind, vehicle-controlled comparison of 0.1% and 0.025% tretinoin creams. *Arch Dermatol.* 1995;131(9):1037-44.
121. Kligman DE, Draelos ZD. High-strength tretinoin for rapid retinization of photoaged facial skin. *Dermatol Surg.* 2004;30(6):864-6.
122. Kligman AM, Dogadkina D, Lavker RM. Effects of topical tretinoin on non-sun-exposed protected skin of the elderly. *J Am Acad Dermatol.* 1993;29(1):25-33.
123. Gilchrist BA. Treatment of photodamage with topical tretinoin: an overview. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(3 Pt 2):S27-36.
124. Serri R, Iorizzo M. Cosmeceuticals: focus on topical retinoids in photoaging. *Clin Dermatol.* 2008;26(6):633-5.
125. Kang S, Duell EA, Fisher GJ, Datta SC, Wang ZQ, Reddy AP, et al. Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or irritation. *J Invest Dermatol.* 1995;105(4):549-56.
126. Han HS, Kwon YJ, Park MS, Park SH, Cho SM, Rho YS, et al. Efficacy validation of synthesized retinol derivatives In vitro: stability, toxicity, and activity. *Bioorg Med Chem.* 2003;11(17):3839-45.
127. Saurat JH, Didierjean L, Masgrau E, Piletta PA, Jaconi S, Chatellard-Gruaz D, et al. Topical retinaldehyde on human skin: biologic effects and tolerance. *J Invest Dermatol.* 1994;103(6):770-4.
128. Kang S, Leyden JJ, Lowe NJ, Ortonne JP, Phillips TJ, Weinstein GD, et al. Tazarotene cream for the treatment of facial photodamage: a multicenter, investigator-masked, randomized, vehicle-controlled, parallel comparison of 0.01%, 0.025%, 0.05%, and 0.1% tazarotene creams with 0.05% tretinoin emollient cream applied once daily for 24 weeks. *Arch Dermatol.* 2001;137(12):1597-604.
129. Kang S, Goldfarb MT, Weiss JS, Metz RD, Hamilton TA, Voorhees JJ, et al. Assessment of adapalene gel for the treatment of actinic keratoses and lentigines: a randomized trial. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(1):83-90.
130. Kim MS, Lee S, Rho HS, Kim DH, Chang IS, Chung JH. The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin in vivo. *Clin Chim Acta.* 2005;362(1-2):161-9.
131. Farris PK. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. *Dermatol Surg.* 2005;31(7 Pt 2):814-7; discussion 8.
132. Spiclin P, Gasperlin M, Kmetec V. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int J Pharm.* 2001;222(2):271-9.
133. Segall AI, Moyano MA. Stability of vitamin C derivatives in topical formulations containing lipoic acid, vitamins A and E. *Int J Cosmet Sci.* 2008;30(6):453-8.
134. Stamford NP. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *J Cosmet Dermatol.* 2012;11(4):310-7.
135. Lupo MP. Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clin Dermatol.* 2001;19(4):467-73.

136. Thiele JJ, Hsieh SN, Ekanayake-Mudiyanse S. Vitamin E: critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. *Dermatol Surg.* 2005;31(7 Pt 2):805-13; discussion 13.
137. Makpol S, Azura Jam F, Anum Mohd Yusof Y, Zurinah Wan Ngah W. Modulation of collagen synthesis and its gene expression in human skin fibroblasts by tocotrienol-rich fraction. *Arch Med Sci.* 2011;7(5):889-95.
138. Blatt T, Littarru GP. Biochemical rationale and experimental data on the antiaging properties of CoQ(10) at skin level. *Biofactors.* 2011;37(5):381-5.
139. Navas P, Villalba JM, de Cabo R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion.* 2007;7 Suppl:S34-40.
140. Hoppe U, Bergemann J, Diembeck W, Ennen J, Gohla S, Harris I, et al. Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer. *Biofactors.* 1999;9(2-4):371-8.
141. Zhang M, Dang L, Guo F, Wang X, Zhao W, Zhao R. Coenzyme Q(10) enhances dermal elastin expression, inhibits IL-1 $\alpha$  production and melanin synthesis in vitro. *Int J Cosmet Sci.* 2012;34(3):273-9.
142. Muta-Takada K, Terada T, Yamanishi H, Ashida Y, Inomata S, Nishiyama T, et al. Coenzyme Q10 protects against oxidative stress-induced cell death and enhances the synthesis of basement membrane components in dermal and epidermal cells. *Biofactors.* 2009;35(5):435-41.
143. Bogdan Allemann I, Baumann L. Hyaluronic acid gel (Juvederm) preparations in the treatment of facial wrinkles and folds. *Clin Interv Aging.* 2008;3(4):629-34.
144. Namjoshi S, Caccetta R, Benson HA. Skin peptides: biological activity and therapeutic opportunities. *J Pharm Sci.* 2008;97(7):2524-42.
145. Gorouhi F, Maibach HI. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *Int J Cosmet Sci.* 2009;31(5):327-45.
146. Katayama K, Armendariz-Borunda J, Raghow R, Kang AH, Seyer JM. A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production. *J Biol Chem.* 1993;268(14):9941-4.
147. Dal Farra C, Bauza E, Domloge N. Heat shock proteins for cosmeceuticals. In: Elsner P, Maibach HI, editors. *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 523-36.
148. Sim GS, Lee DH, Kim JH, An SK, Choe TB, Kwon TJ, et al. Black rice (*Oryza sativa* L. var. japonica) hydrolyzed peptides induce expression of hyaluronan synthase 2 gene in HaCaT keratinocytes. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(2):271-9.
149. Blanes-Mira C, Clemente J, Jodas G, Gil A, Fernandez-Ballester G, Ponsati B, et al. A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. *Int J Cosmet Sci.* 2002;24(5):303-10.
150. Simeon A, Wegrowski Y, Bontemps Y, Maquart FX. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol.* 2000;115(6):962-8.
151. Fitzpatrick RE, Rostan EF. Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther.* 2003;5(1):25-34.
152. Ehrlich M, Rao J, Pabby A, Goldman MP. Improvement in the appearance of wrinkles with topical transforming growth factor  $\beta$ (1) and L-ascorbic acid. *Dermatol Surg.* 2006;32(5):618-25.

153. Gold MH, Goldman MP, Biron J. Efficacy of novel skin cream containing mixture of human growth factors and cytokines for skin rejuvenation. *J Drugs Dermatol*. 2007;6(2):197-201.
154. Huljev D, Moore Z, Triller Ć. Patofiziologija cijeljenja rane. *Acta Med Croatica*. 2011;65 (Supl. 2):5/13.
155. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*. 2001;107(2):135-42.
156. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998-1008.
157. Rokhsar CK, Lee S, Fitzpatrick RE. Review of photorejuvenation: devices, cosmeceuticals, or both? *Dermatol Surg*. 2005;31(9 Pt 2):1166-78; discussion 78.
158. Brandt FS, Cazzaniga A. Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. *Clin Interv Aging*. 2008;3(1):153-9.
159. Iannitti T, Bingol AO, Rottigni V, Palmieri B. A new highly viscoelastic hyaluronic acid gel: rheological properties, biocompatibility and clinical investigation in esthetic and restorative surgery. *Int J Pharm*. 2013;456(2):583-92.
160. Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J Cosmet Laser Ther*. 2008;10(1):35-42.
161. Wang F, Garza LA, Kang S, Varani J, Orringer JS, Fisher GJ, et al. In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Arch Dermatol*. 2007;143(2):155-63.
162. Cevc G, Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *J Control Release*. 2010;141(3):277-99.
163. Al-Amoudi A, Dubochet J, Norlen L. Nanostructure of the epidermal extracellular space as observed by cryo-electron microscopy of vitreous sections of human skin. *J Invest Dermatol*. 2005;124(4):764-77.
164. Albery WJ, Hadgraft J. Percutaneous absorption: in vivo experiments. *J Pharm Pharmacol*. 1979;31(3):140-7.
165. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res*. 2003;42(1):1-36.
166. Scheuplein RJ, Blank IH. Permeability of the skin. *Physiol Rev*. 1971;51(4):702-47.
167. Karadzovska D, Brooks JD, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Predicting skin permeability from complex vehicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(2):265-77.
168. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(5):603-18.
169. Karande P, Jain A, Ergun K, Kispersky V, Mitragotri S. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4688-93.
170. Kanikkannan N, Kandimalla K, Lamba SS, Singh M. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Curr Med Chem*. 2000;7(6):593-608.
171. Aungst BJ, Blake JA, Hussain MA. Contributions of drug solubilization, partitioning, barrier disruption, and solvent permeation to the enhancement of skin permeation of various compounds with fatty acids and amines. *Pharm Res*. 1990;7(7):712-8.
172. Robinson LR, Fitzgerald NC, Doughty DG, Dawes NC, Berge CA, Bissett DL. Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin. *Int J Cosmet Sci*. 2005;27(3):155-60.

173. Choi HI, Kim HJ, Park JI, Shin EH, Kim DW, Kim SS. Design and efficient synthesis of novel ascorbyl conjugated peptide with high collagen biosynthesis stimulating effects. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(7):2079-82.
174. Park J-I, Kim H-J, Kim D-W, Lim C-J, Kang J-P, Park K-Y, et al. Stabilized vitamin C derivatives having a peptide molecule, preparation method thereof, and composition containing the same. World Intellectual Property Organization, 2007.
175. Kaur IP, Agrawal R. Nanotechnology: a new paradigm in cosmeceuticals. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2007;1(2):171-82.
176. Pepić I, Vujčić M, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Nanočestice u dermatokozmetičkim pripravcima: liposomi, mikroemulzije i polimerne micle. *Farm Glas*. 2012;68:763-72.
177. Golubovic-Liakopoulos N, Simon SR, Shah B. Nanotechnology use with cosmeceuticals. *Semin Cutan Med Surg*. 2011;30(3):176-80.
178. Muller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):522-30.
179. Fresno Contreras MJ, Jimenez Soriano MM, Ramirez Dieguez A. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *Int J Pharm*. 2005;297(1-2):134-45.
180. Manconi M, Sinico C, Caddeo C, Vila AO, Valenti D, Fadda AM. Penetration enhancer containing vesicles as carriers for dermal delivery of tretinoin. *Int J Pharm*. 2011;412(1-2):37-46.
181. Gillet A, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;79(1):43-53.
182. Ogunsola OA, Kraeling ME, Zhong S, Pochan DJ, Bronaugh RL, Raghavan SR. Structural analysis of "flexible" liposome formulations: new insights into the skin-penetrating ability of soft nanostructures. *Soft Matter*. 2012;8(40):10226-32.